

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



**Cambios en el perfil inmunohistoquímico tras tratamiento
neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Rebeca Mondéjar Solís

Directores

Miguel Martín Jiménez

Ramón Colomer Bosch

Madrid, 2017

ISBN: 978-84-608-2506-7

© Rebeca Mondéjar Solís, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**CAMBIOS EN EL PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO TRAS
TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN PACIENTES CON
CÁNCER DE MAMA**

REBECA MONDÉJAR SOLÍS

MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**CAMBIOS EN EL PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO TRAS
TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN PACIENTES CON
CÁNCER DE MAMA**

MEMORIA PARA OPTAR A GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Rebeca Mondéjar Solís

Bajo la dirección de los doctores

Miguel Martín Jiménez

Ramón Colomer Bosch

Madrid, 2015

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**CAMBIOS EN EL PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO TRAS
TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN PACIENTES CON
CÁNCER DE MAMA**

DIRECTORES:

**MIGUEL MARTÍN JIMÉNEZ
RAMÓN COLOMER BOSCH**

ISBN: 978-84-608-2506-7

AGRADECIMIENTOS.....

Me gustaría dar las gracias de una manera muy especial a mis directores. Al Dr. Martín por animarme y ayudarme a emprender este proyecto y por facilitarme que finalmente haya sido posible. Al Dr. Colomer por unirse a nosotros. Gracias por confiar en mí, por tus consejos, tus rigurosas revisiones y tu tiempo, incluso en momentos difíciles.

Deseo expresar mi agradecimiento a mis compañeros del Hospital Gregorio Marañón, Hospital de Alcorcón, Hospital Virgen de la Luz (Cuenca) y Hospital de La Princesa por su apoyo profesional y personal durante estos años.

Gracias a mis amigos, por su apoyo incondicional en los momentos de flaqueza. Gracias Agnes, por aparecer en nuestras vidas. Gracias Elia, por tu profesionalidad y por trasmitirme la ilusión por tu trabajo haciendo fácil lo difícil.

Por último, aunque se trata de un proyecto de investigación, éste no hubiera sido posible sin el apoyo de mi familia. Gracias a mis padres por enseñarme el camino y a mi hermana por acompañarme de la mano en cada paso. Gonzalo, gracias por tu infinita paciencia, comprensión y por el tiempo robado a nuestra historia.

Gracias a todos los que de alguna manera habéis permitido que este sueño sea una realidad. Este trabajo es también vuestro.

"El que da, no debe volver a acordarse; pero el que recibe nunca debe olvidar"

(Proverbio hebreo)

ÍNDICE.....

AGRADECIMIENTOS.....	1
ÍNDICE.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. GENERALIDADES	11
1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA.....	14
1.3. DIAGNÓSTICO, ESTADIAJE Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA.....	18
1.4. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE RECEPTORES.....	24
1.4.1. INTRODUCCIÓN.....	24
1.4.2. DETERMINACIÓN DE RECEPTORES HORMONALES. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	24
1.4.3. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE HER2. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA E HIBRIDACIÓN IN SITU.....	27
1.5. PLATAFORMAS GENÓMICAS.....	30
1.6. SUBTIPOS BIOLÓGICOS DEL CÁNCER DE MAMA.....	37
1.7. QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE.....	46
1.8. MEDICIÓN DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	48
1.8.1. EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA RESPUESTA TUMORAL.....	48
1.8.2. EVALUACIÓN PATOLÓGICA DE LA RESPUESTA TUMORAL.....	48
1.8.2a. CLASIFICACIÓN DE MILLER & PAYNE.....	49
1.8.2b. CLASIFICACIÓN RCB (RESIDUAL CANCER BURDEN) DE SYMMANS.....	50

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	53
2.1. HIPÓTESIS.....	55
2.2. OBJETIVOS.....	56
 3. MATERIAL Y MÉTODOS	59
3.1. SUJETOS DEL ESTUDIO	61
3.2. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO CLÍNICO.....	61
3.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL TUMOR.....	66
3.3.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	66
3.3.2. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA Y ESTUDIO DE LA AMPLIFICACIÓN DE HER2 POR FISH (Hibridación fluorescente in situ).....	68
3.3.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS TUMORES MEDIANTE MICROARRAYS. CLASIFICACIÓN EN SUBTIPOS INTRÍNSECOS.....	70
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	74
 4. RESULTADOS	79
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO.....	79
4.2. CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS DE LOS TUMORES EN FUNCIÓN DEL SUBTIPO INTRÍNSECO (PAM50).....	82
4.3. VALORACIÓN DEL CAMBIO DE LOS RECEPTORES DETERMINADOS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA TRAS LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE.....	85
4.4. VALORACIÓN DEL CAMBIO DE SUBTIPO TUMORAL DEFINIDO MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	88

4.5. ESTUDIO DE CONCORDANCIA DEL SUBTIPO DEFINIDO MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA Y EL SUBTIPO INTRÍNSECO (PAM50).....	92
4.6. VALIDEZ DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA DEL SUBTIPO INTRÍNSECO EN COMPARACIÓN CON EL GOLD STANDARD (PAM50).....	96
4.7. SEGURIDAD DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA DEL SUBTIPO INTRÍNSECO EN COMPARACIÓN CON EL GOLD STANDARD (PAM50).....	98
4.8. EFICACIA DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA DEL SUBTIPO INTRÍNSECO EN COMPARACIÓN CON EL GOLD STANDARD (PAM50).....	100
4.9. ESTUDIO DE RESPUESTA TUMORAL AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE.....	102
4.9.1 . RESPUESTA TUMORAL EN FUNCIÓN DEL SUBTIPO-IHQ Y SUBTIPO INTRÍNSECO: CLASIFICACIÓN SYMMANS Y CLASIFICACIÓN MILLER & PAYNE.....	102
4.9.2. RESPUESTA TUMORAL EN FUNCIÓN DEL SUBTIPO-IHQ Y SUBTIPO INTRÍNSECO: RESPUESTA COMPLETA PATOLÓGICA.....	105
5. DISCUSIÓN.....	109
5.1. INTRODUCCIÓN.....	111
5.2. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS.....	113
5.3. CAMBIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS EN LOS RE, RP, HER2 TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE: PAPEL DE LA QUIMIOTERAPIA. COMPARACIÓN DE NUESTRA SERIE CON LA LITERATURA.....	115
5.3.1. VARIACIONES EN LOS RE, RP Y HER2 EN MUESTRAS SUCESIVAS SIN INTERVENCIÓN FARMACOLÓGICA.....	115
5.3.2. VARIACIONES EN LOS RECEPTORES HORMONALES Y KI67 TRAS HORMONOTERAPIA NEOADYUVANTE.....	122

5.3.3 . VARIACIONES EN LOS RECEPTORES HORMONALES TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE: ¿RELACIONADOS CON EL TRATAMIENTO DE QUIMIOTERAPIA?.....	123
5.3.4. VARIACIONES EN LOS RECEPTORES HORMONALES TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE: IMPLICACIONES PRONÓSTICAS.....	127
5.3.5. CAMBIOS EN LA SOBREEXPRESIÓN Y/O AMPLIFICACIÓN DE HER2 TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE.....	129
5.4. NIVELES DE EXPRESIÓN DE KI67 TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE.....	133
5.5. CONCORDANCIA ENTRE LOS SUBTIPOS INTRÍNSECOS Y LOS SUBTIPOS DEFINIDOS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	138
5.6. VALIDEZ , SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA DEL SUBTIPO INTRÍNSECO. ¿QUÉ IMPLICA EMPLEAR LAS DOS DETERMINACIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS?.....	149
5.7. RESPUESTA TUMORAL AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE: DIFERENCIAS ENTRE LOS SUBTIPOS INTRÍNSECOS Y LOS SUBTIPOS DEFINIDOS MEDIANTE TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	150
6. CONCLUSIONES.....	155
7. RESUMEN.....	159
8. SUMMARY.....	167
9. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	175
10. BIBLIOGRAFÍA.....	181

1.INTRODUCCIÓN.....

1.1. GENERALIDADES

La mama está formada por tres estructuras: la piel, el tejido subcutáneo y el tejido mamario. El tejido mamario incluye el parénquima glandular y el estroma. El parénquima mamario está organizado en 8-15 lóbulos formados por lobulillos y alveolos que drenan a través de conductos colectores a nivel del pezón.

El estroma y el tejido subcutáneo están compuestos por tejido graso, tejido conectivo, vasos sanguíneos, nervios y vasos linfáticos (Figura 1).

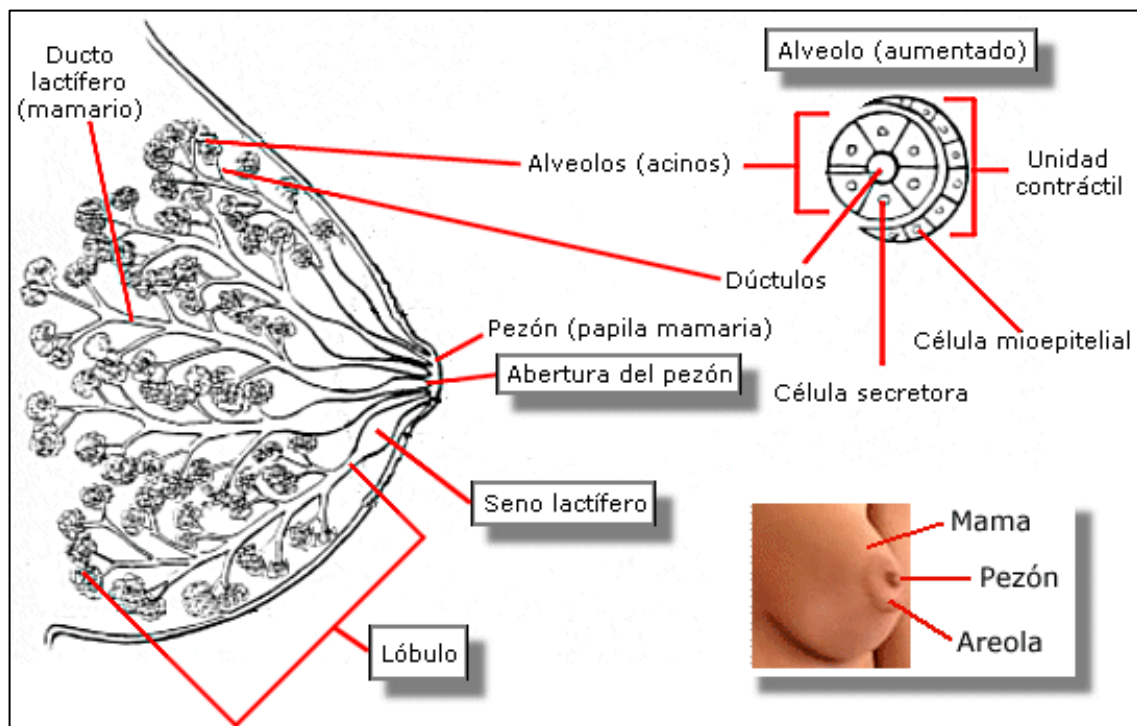


Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria.

Fuente: <http://www.upch.edu.pe/portal/>.

Los vasos linfáticos de la mama drenan en su mayoría a los ganglios linfáticos axilares. A su vez, estas cadenas ganglionares axilares, pueden clasificarse en ganglios apicales o infraclaviculares, mediales al músculo pectoral menor, y los ganglios linfáticos de la vena axilar. Otros ganglios regionales donde puede producirse el drenaje mamario son: los ganglios de la cadena mamaria interna, ganglios supraclaviculares o intramamarios.

Los nódulos mamarios sólidos son en la mayoría de los casos lesiones benignas (papilomas o fibroadenomas) pero ante la aparición de una lesión no quística debe considerarse la posibilidad de que se trate de un cáncer de mama.

El cáncer de mama infiltrante se define como la proliferación neoplásica maligna de la unidad ducto-lobulillar de la glándula mamaria con invasión de la membrana basal y se diferencia del carcinoma in situ porque éste no presenta invasión de membrana basal que hace que haya menor probabilidad de invasión linfática y vascular a distancia que en los tumores infiltrantes. El subtipo más frecuente de carcinoma infiltrante es el carcinoma ductal infiltrante pero existen otros subtipos histológicos (Tabla 1).

Tras la confirmación de lesión mamaria maligna es necesario caracterizar molecularmente el tipo histológico del tumor y sobre todo las características biológicas del mismo habitualmente mediante la cuantificación de los receptores hormonales (RH) (receptores de estrógeno [RE] y receptores de progesterona [RP]), el índice de proliferación ki67, la expresión de HER2 (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano) y el grado histológico (Tablas 2 y 3).

CLASIFICACIÓN CARCINOMA INFILTRANTE DE MAMA (OMS, 2012)

Muy frecuente: Carcinoma ductal infiltrante (70 %)

Frecuente: Lobulillar (10 %), Cribiforme, Micropapilar, Apocrino, Tubular, Mucinoso (células anillo de sello), Papilar, Neuroendocrino.

Muy infrecuentes: Oncocítico, Células acinares, Sebáceo, Medular, Secretor, Adenoide quístico, Metaplásico, Rico en lípidos, Rico en glucógeno.

Tabla 1. Clasificación histológica del cáncer de mama. Adaptada de: Lakhani SR et al. WHO Classification of Tumours of the Breast, Fourth Edition. WHO Classification of Tumours, Volume 4. IARC WHO Classification of Tumours, Volume 4. 2012.

A su vez, es fundamental realizar un correcto estadiaje local y a distancia antes de iniciar el tratamiento médico o quirúrgico.

RECEPTORES HORMONALES (RECEPTOR DE ESTRÓGENO Y PROGESTERONA)

POSITIVO: $\geq 1\%$ de inmunotinción nuclear de RH.

NEGATIVO: $<1\%$ de inmunotinción nuclear de RH.

HER2- IHQ:

0+ : Ausencia de tinción de membrana o tinción en menos del 10% de las células.

1+ : Tinción de la membrana incompleta y ligera en más del 10% de las células tumorales

2+ : Tinción de la membrana completa ligera o moderada en más del 10% de las células tumorales.

3+ : Tinción de la membrana completa intensa en más del 10% de las células tumorales.

HER2 POSITIVO: 3+

HER 2 NEGATIVO: 1+

HER 2 EQUÍVOCO: 2+

HER2 –FISH:

HER2 POSITIVO: HER2/CEP17 ≥ 2 o ≥ 6 copias de HER2/núcleo.

HER2 NEGATIVO: HER2/CEP17 < 2 y ≤ 4 copias de HER2/núcleo.

HER2 EQUÍVOCO: HER2/CEP17 < 2 y 4-6 copias de HER2/núcleo.

Tabla 2. Cuantificación de los receptores hormonales y HER2.

GRADO HISTOLÓGICO (Grado combinado de Nottingham)

GX No valorable

G1 Grado histológico bajo, de 3-5 puntos, favorable

G2 Grado intermedio, de 6-7 puntos, moderadamente favorable

G3 Grado histológico alto, 8-9 puntos, desfavorable.

Formación de túbulos

Score 1: >75% del tumor forma túbulos

Score 2: 10% -75% del tumor formación túbulos

Score 3: <10% de formación de túbulos.

Tamaño nuclear

Score 1: el núcleo tumoral similar en tamaño a la célula epitelial ductal (2-3 hematíes)

Score 2: núcleo de tamaño intermedio

Score 3: núcleo grande, vesiculado y nucleolo prominente.

Mitosis (x 10 cga con objetivo de 40x y en área de 0.196 mm)

Score 1: 0-7 mitosis

Score 2: 8-14 mitosis

Score 3: 15 ó más mitosis

 Tabla 3. Grado histológico combinado de Nottingham.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama constituye un grave problema de salud en el mundo siendo la neoplasia maligna más frecuente en mujeres y la segunda causa de muerte por cáncer tras el cáncer de pulmón. En mujeres entre la tercera y quinta década de la vida es la primera causa de muerte por cáncer (Figura 2 y 3).

En España, el cáncer de mama es la primera causa de cáncer en mujeres y la cuarta en ambos sexos. Se diagnostican 67,3 casos nuevos de cáncer de mama por cada 100.000 habitantes/año, su incidencia es del 11,7% y se asocia a una mortalidad del 5,9%. Es el tumor con una mayor prevalencia estimada a 5 años (17,9%)^(1, 2).

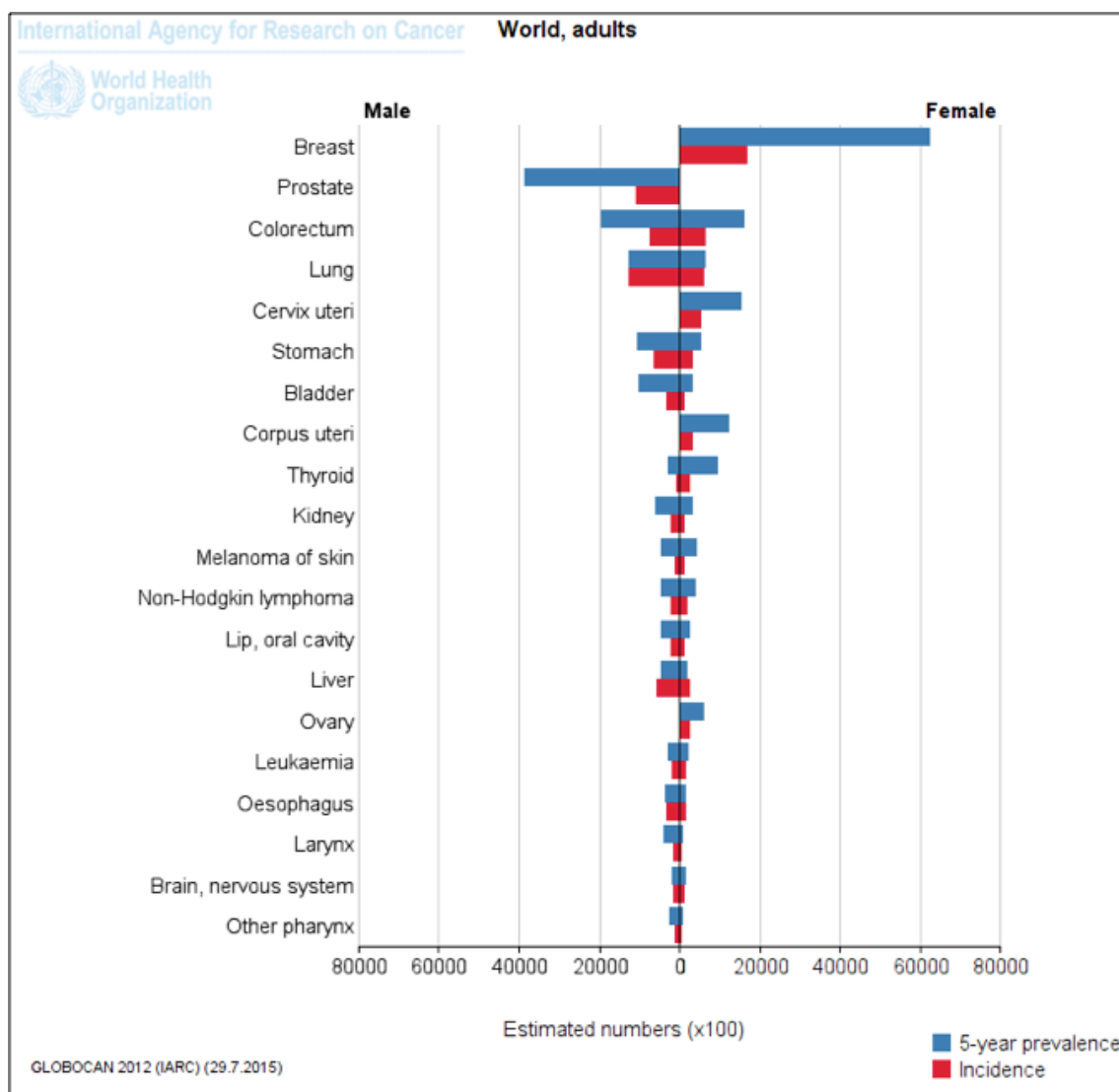


Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer en el mundo. Fuente: Ferlay J et al. F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013.

Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>.

El cáncer de mama es más frecuente en la sociedad occidental que en la sociedad oriental debido al cambio en los hábitos higiénico-dietéticos y culturales de la misma (Figura 3).

Aunque su incidencia está en aumento, la mortalidad por esta patología ha descendido

en los últimos años en los países desarrollados gracias al diagnóstico precoz y la mejora en el tratamiento de estos tumores. Actualmente, aproximadamente el 90% de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama localmente avanzado están vivas a los 5 años del diagnóstico (Figura 4).

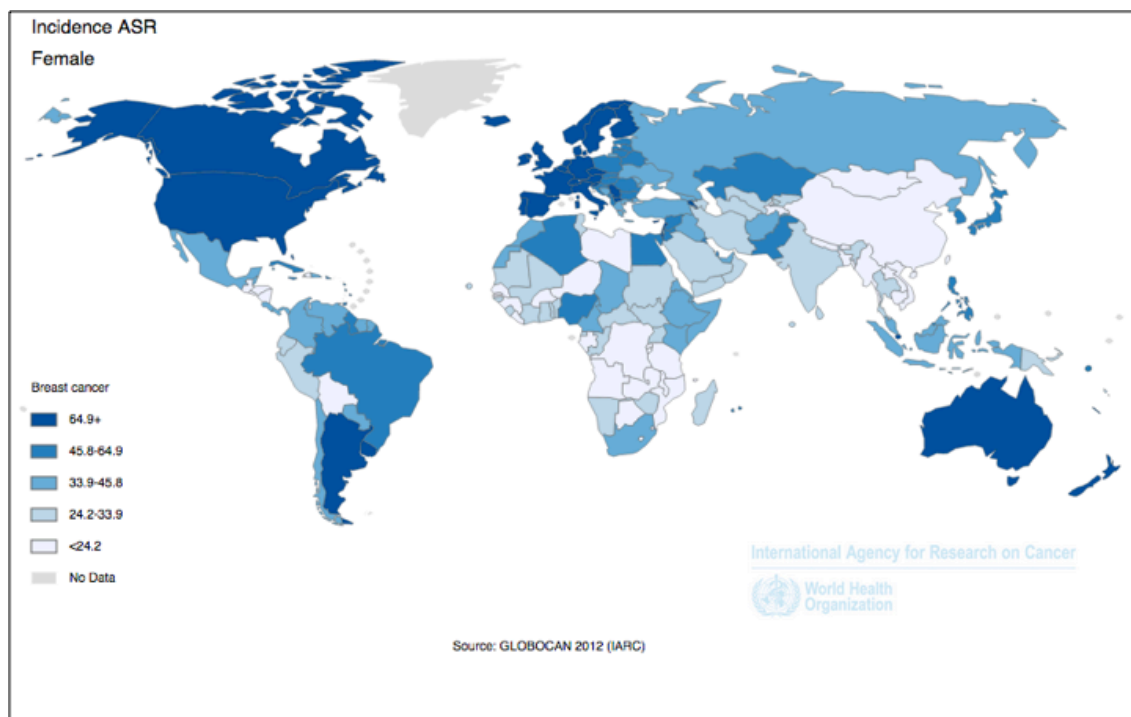


Figura 3. Incidencia de cáncer de mama en el mundo. Fuente: Ferlay J et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013.

Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>.

La edad, factores hormonales, vida reproductiva retrasada, factores heredofamiliares, los factores dietéticos, el sobrepeso, los carcinógenos químicos como el alcohol, los carcinógenos físicos como las radiaciones ionizantes y la patología premaligna de la mama predisponen al desarrollo de cáncer de mama.

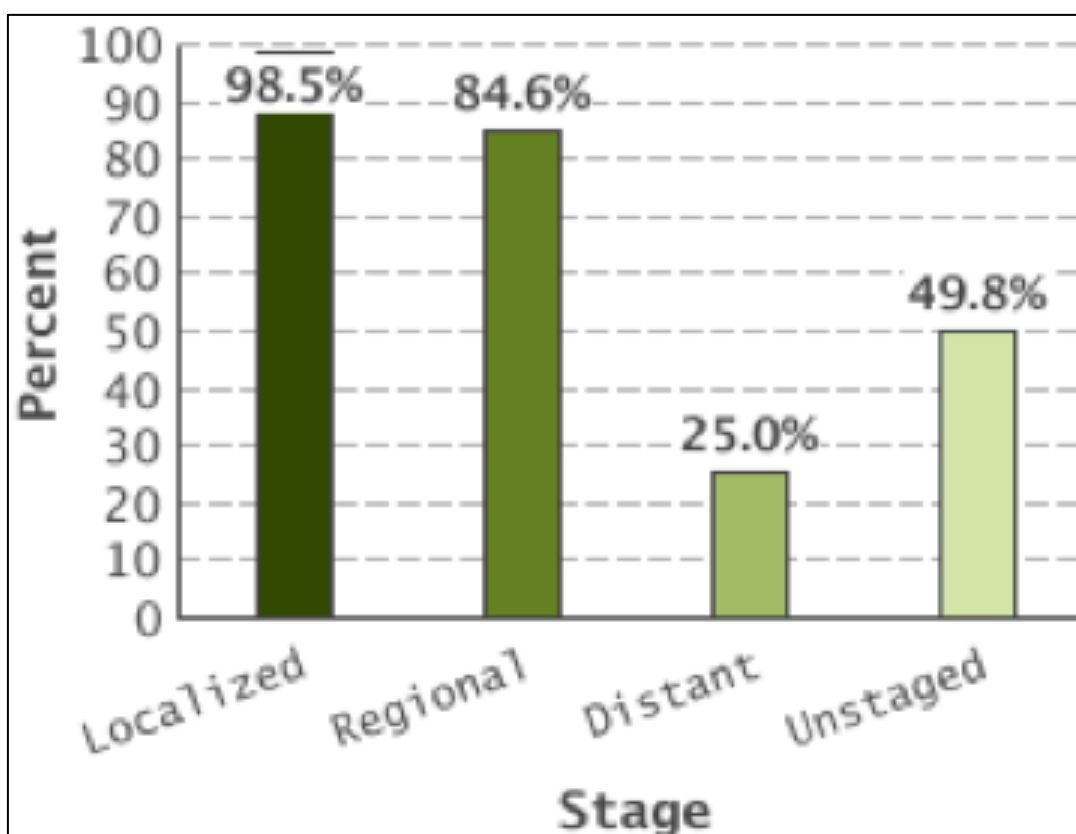


Figura 4. Supervivencia global a los 5 años en base al estadio tumoral al diagnóstico. Fuente: National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology and End Resources Program [Internet] based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015. [cited June 2015].

Disponible en: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/.

Uno de los factores de riesgo ambientales mas importantes es la prolongada exposición a estrógenos por lo que la nuliparidad, menopausia tardía o menarquia precoz así como la edad tardía del primer embarazo, el sobrepeso en la menopausia y la terapia hormonal sustitutiva predisponen al cáncer de mama mientras que la actividad física periódica, sin embargo, es un factor protector⁽³⁾.

El 5-10% de los diagnósticos de cáncer de mama en la población general son de origen hereditario⁽⁴⁾. La existencia de historia familiar de cáncer de mama aumenta el riesgo

de desarrollar esta enfermedad debido a que existen factores ambientales y factores genéticos hereditarios que contribuyen a esta asociación. Un pequeño porcentaje de pacientes con historia familiar de cáncer de mama está en relación con la mutación germinal de los genes BRCA1 y BRCA2 (genes relacionados con el Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario). Existen otros síndromes hereditarios asociados a cáncer de mama hereditario como el síndrome de Li Fraumeni (asociado a la mutación germinal de p53) o la enfermedad de Cowden (PTEN) responsables de un pequeño porcentaje de los diagnósticos de cáncer de mama.

1.3. DIAGNOSTICO, ESTADIAJE Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

Para el diagnóstico del cáncer de mama el examen mamario rutinario es fundamental. El examen mamario es dificultoso en mujeres jóvenes debido a los cambios en el tejido mamario por el ciclo menstrual pero las técnicas de imagen mamaria nos ayudan a definir la etiología de dichas lesiones. En pacientes menores de 35 años se recomienda el estudio inicial mediante ecografía, ampliándose el estudio mediante mamografía en mujeres de 35-40 años. En pacientes mayores de 40 años el estudio radiológico se basa en la realización de mamografía diagnóstica.

Tras las técnicas de imagen debe realizarse un estudio histológico confirmatorio en caso de que la lesión sea sospechosa de malignidad. La técnica diagnóstica de elección es la biopsia con aguja gruesa (BAG) o también llamada biopsia por trucut. Sólo en el caso de que la biopsia no fuera concluyente estaría indicada la biopsia excisional.

Para realizar un correcto estadiaje local se puede completar el estudio con la

realización de una resonancia magnética (RM) mamaria y se debe realizar estudio axilar.

El riesgo de metástasis en las cadenas ganglionares loco-regionales depende del tamaño tumoral, grado histológico y la presencia de invasión linfática tumoral. Aunque la cadena mamaria interna y los ganglios supraclaviculares pueden estar afectados, esta afectación suele acompañarse de afectación axilar previa. En las pacientes con adenopatías axilares sospechosas se debe realizar confirmación histológica mediante punción aspiración con aguja fina (PAAF). En el caso de confirmarse histológicamente la afectación ganglionar está indicada la linfadenectomía axilar.

En el caso de que la punción no proporcione confirmación histológica de malignidad esta indicado completar el estudio con la realización de la biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC).

En aquellas pacientes en las que no existe sospecha clínica de afectación axilar se puede realizar BSGC antes o después del tratamiento neoadyuvante, en los casos indicados. En el caso de presentar ganglios centinela patológicos se realiza linfadenectomía axilar en la mayoría de los casos.

En las pacientes con tumores localmente avanzados con afectación ganglionar axilar confirmada histológicamente que reciben tratamiento de QT previo a la cirugía (QT neoadyuvante) debe realizarse el estudio axilar de nuevo tras el tratamiento de QT neoadyuvante. Se realiza linfadenectomía axilar en todos los casos clínicamente positivos tras la QT neoadyuvante. En los casos clínicamente negativos, habitualmente se realiza también linfadenectomía axilar aunque se podría valorar la realización de BSGC.

Indicaciones de realización de BSGC⁽⁵⁾:

- 1. Carcinomas infiltrantes T1, T2 y T3, siempre que la axila sea clínica, ecográfica y /o patológicamente negativa.
- 2. En los casos de carcinoma intraductal con indicación de mastectomía o alto riesgo para microinfiltración o infiltración en base a alguno de los siguientes criterios: diámetro ≥ 3 cm, palpable, alto grado histológico, comedonecrosis.

Criterios de exclusión o contraindicación de realización de BSGC:

- 1. La verificación preoperatoria de afectación ganglionar mediante pruebas de imagen (ecografía) y, al menos, citología de las adenopatías sospechosas con diagnóstico compatible con metástasis de carcinoma.
- 2. Carcinoma inflamatorio.
- 3. Radioterapia (RT) axilar previa.
- 4. Carcinoma localmente avanzado con afectación ganglionar, en ausencia de tratamiento sistémico primario.

Para completar el estudio de extensión a distancia, en función del estadiaje local y el subtipo tumoral, se recomienda el estudio mediante tomografía axial computarizada (TAC) torácica y abdominal y gammagrafía ósea en pacientes con tumores localmente avanzados (Estadio III) y solamente se recomiendan dichos estudios radiológicos en pacientes con tumores en estadios precoces en caso de sospecha por sintomatología o alteraciones analíticas (función hepática, enzimas óseas, etc.)⁽⁶⁾.

El sistema de estadificación más empleado es el sistema establecido por la American Joint Committee on Cancer⁽⁷⁾ (AJCC), es un sistema de estadificación clínico y anatomopatológico que se basa en el sistema TNM: en el tamaño tumoral (T), afectación ganglionar (N) y afectación metastásica (M), Sistema TNM (Tabla 4 y 5).

<p>TUMOR PRIMARIO (T) Tx: No se puede evaluar el tumor primario. T0: No existe prueba de tumor primario. Tis: Carcinoma ductal in situ. T1: El tumor mide ≤ 20 mm en su diámetro mayor T2: El tumor mide > 20 mm pero ≤ 50 mm en su diámetro mayor. T3: El tumor mide > 50 mm en su diámetro mayor. T4: Cualquier tamaño con extensión directa a pared costal o a piel.</p> <p>GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)</p> <p>CLASIFICACIÓN CLÍNICA: Nx: No se pueden valorar los ganglios regionales. N0: Ausencia de metástasis linfática regional. N1: Metástasis ipsilateral axilar movable (nivel I y II axilar). N2: N2a: Metástasis ipsilaterales niveles I y II axilares fijos. N2b: Metástasis en región ganglionar mamaria interna sin afectación de ganglios axilares. N3: N3a: Metástasis en ganglios axilares infraclaviculares ipsilaterales. N3b: Metástasis en región ganglionar mamaria interna ipsilaterales y axilares. N3c: Metástasis ipsilaterales supraclaviculares.</p> <p>CLASIFICACIÓN PATOLÓGICA: pNx: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales. pN0: Sin evidencia histológica de metástasis en ganglios linfáticos regionales. pN1 pN1mi: Micrometástasis (> 0,2 mm y/o más de 200 células, pero < 2,0 mm). pN1a: Metástasis en 1-3 axilares y al menos una de ellas > 2 mm. pN1b: Metástasis en ganglios mamaros internos con afectación micrometastásica-macrometastásica del ganglio centinela sin detección clínica. pN1c: Metástasis en 1-3 ganglios axilares y mamaros internos con afectación micrometastásica-macrometastásica del ganglio centinela sin detección clínica. pN2: Metástasis en 4-9 ganglios axilares o afectación mamaria interna clínicamente sin afectación axilar. pN3 pN3a: Metástasis en ≥ 10 ganglios axilares (al menos uno > 2 mm) o metástasis en ganglios infraclaviculares. pN3b: Metástasis en > 3 ganglios axilares y mamaros internos detectados clínicamente, o > 3 ganglios axilares o afectación de cadena mamaria interna (micrometástasis-macrometástasis ganglio centinela) sin detección clínica. pN3c: Metástasis linfática supraclavicular ipsilateral.</p> <p>METASTÁSIS A DISTANCIA (M) Mx: No evaluadas. M0: No existen pruebas clínicas o radiológicas de metástasis a distancia. M1: Metástasis a distancia detectada clínica o radiológicamente o por medios histológicos > 0,2 mm.</p>

Tabla 4. Sistema de estadiaje TNM abreviado. 7ª Edición. Adaptada de: Edge SB et al. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Ann Surg Oncol. 2010;17(6):1471-4.

La mayoría de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama no presentan enfermedad metastásica y se encuentran en estadios localizados. En estos pacientes el tratamiento depende del estadio diagnóstico y el subtipo biológico de cáncer de mama.

ESTADIO O	Tis	N0	M0
ESTADIO IA	T1	N0	M0
ESTADIO IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
ESTADIO IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
ESTADIO IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
ESTADIO IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1 o N2	M0
ESTADIO IIIB	T4	N0 o N1 o N2	M0
ESTADIO IIIC	Cualquier T	N3	M0
ESTADIO IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 5. Estadios en cáncer de mama. Sistema TNM. 7ª Edición. Adaptada de: Edge SB et al. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Ann Surg Oncol. 2010;17(6):1471-4.

Se consideran estadios iniciales aquellos diagnosticados con estadio clínico I, IIA y un subtipo de estadio IIB (T2N1) y se considera enfermedad localmente avanzada aquellos con tumores de gran tamaño (mayores de 5 cm), aquellos que invaden piel o los músculos de pared torácica o aquellos que producen afectación ganglionar fija locorregional y algunos autores los definen como aquellos tumores localizados no subsidiarios de cirugía inicialmente. Por lo tanto se definen como tumores localmente

avanzados aquellos en estadio clínico IIB (T3N0) y estadio IIIA , IIIB y IIIC.

En los tumores en estadios iniciales el tratamiento inicial habitualmente es la cirugía seguido de hormonoterapia, QT y/o RT en función de las características biológicas tumorales, tamaño tumoral y número de ganglios regionales afectos.

La mayoría de los tumores localmente avanzados reciben tratamiento con QT neoadyuvante con intención de reducir el volumen tumoral y facilitar la cirugía conservadora. El abordaje quirúrgico depende del tamaño tumoral, la presencia de tumor multifocal y el tamaño de la mama. Las opciones quirúrgicas incluyen la cirugía conservadora de la mama asociada a RT adyuvante o la mastectomía. En el caso de que esté indicada la mastectomía se plantea RT adyuvante en pacientes con alto riesgo de recaída local⁽⁸⁾.

Aquellas pacientes con tumores hormono-sensibles reciben terapia hormonal tras la cirugía al menos durante 5 años⁽⁹⁻¹³⁾ y aquellas pacientes con tumores que sobreexpresan la proteína HER2 reciben tratamiento con trastuzumab durante 1 año, asociándose inicialmente al tratamiento con QT (neoadyuvante/adyuvante)⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

1.4. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE RECEPTORES

1.4.1. INTRODUCCIÓN

La aparición de las nuevas técnicas de biología molecular nos permiten conocer de manera mas exhaustiva y precisa las características de cada tumor pero actualmente estas técnicas son poco accesibles por lo que se emplean técnicas más sencillas y accesibles como la tinción por IHQ para determinar los niveles de expresión de los RE y RP así como el índice de proliferación ki67 y las técnicas de IHQ y de hibridación in situ (HIS) para la determinación de HER2.

1.4.2. DETERMINACIÓN DE RECEPTORES HORMONALES. INMUNOHISTOQUÍMICA

Actualmente la determinación de la expresión de los RH en el tejido tumoral se realiza de manera rutinaria en todas las pacientes con cáncer de mama invasivo ,empleando técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), con el fin de identificar las pacientes subsidiarias de terapia hormonal ya que todos los pacientes con cáncer de mama positivos para la expresión de RH se benefician de tratamiento hormonal.

Esta técnica, se realiza en cortes finos de tumores extraídos de muestras conservadas en formol, incluidas en parafina o de biopsias congeladas. Se realizan cortes de 4-5 microm y se colocan en portaobjetos de cristal adhesivo. Posteriormente los cortes se incuban con un anticuerpo primario que se une al RE o RP y posteriormente se añade un segundo anticuerpo, que se une a los anticuerpos primarios anti-receptor

hormonal, unido a una enzima capaz de hacer cambiar de color un sustrato incoloro (diaminobenzidina). Tras dicha unión, se realiza una tinción de contraste en los cortes para hacer una correcta medición cuantitativa al microscopio de la cantidad de proteína presente en el núcleo celular.

Debido a que esta técnica es una técnica barata, útil en tumores con celularidad escasa, sencilla y que no precisa de un equipamiento especializado, es la técnica de elección actualmente.

Esta técnica tiene varias limitaciones. En primer lugar implica que el tejido debe ser fijado en condiciones óptimas inmediatamente después de su extracción y además las variaciones en la aplicación de la técnica en cada laboratorio pueden reducir su reproducibilidad. Otro factor que puede explicar la variabilidad de los resultados es la lectura e interpretación de los mismos ya que se mide de manera subjetiva la intensidad de la reacción o el número de núcleos inmunoreactivos (variabilidad intra e inter-observador).

Por esta razón en 2010 el Colegio Americano de Patólogos (CAP) en colaboración con la Sociedad Americana de Oncología Médica (ASCO) publicaron una guía de las recomendaciones para la realización de dicha determinación.

Recomendaciones de CAP/ASCO 2010⁽¹⁷⁾:

1.- BIOPSIA: Se recomienda que la muestra tumoral sea representativa y extensa. Es preferible una muestra de biopsia extensa que la pieza quirúrgica dado que ésta está

expuesta normalmente a mayor tiempo de isquemia y el procesado de la muestra es más lento.

2.- FIJADO DE LA MUESTRA: El fijado debe durar más de 6 horas y menos de 72 horas.

Se recomienda realizar el fijado en una solución neutra de formol al 10%.

3.- LABORATORIO: La IHQ es el método estándar para la determinación de RH. Debe realizarse en un laboratorio acreditado o que cumpla las recomendaciones de procesamiento, fijado, interpretación y realice controles de validación asegurando que exista una correlación del 90% en los casos positivos y un 95% en los casos negativos con controles de laboratorios acreditados.

4.- INTERPRETACIÓN: El informe debe especificar el porcentaje de células tumorales que tiñen cada receptor. Debe evaluarse todo el tejido tumoral presente en los cortes y su cuantificación debe ser manual o por imagen. En el caso de tratarse de una citología deben evaluarse al menos 100 células.

Se considera el resultado positivo en el caso de que haya al menos un 1% de células tumorales que tiñan para el RH y negativo en el caso de que este valor sea menor al 1%.

Ocasionalmente el resultado no es interpretable como en el caso de que existan errores en el procesamiento y fijado de la muestra o en aquellos casos en los que los controles (tejido mamario sano) no presenten expresión de RH y tampoco lo haga la muestra tumoral. En estos casos se recomienda repetir el proceso de determinación de RH mediante IHQ.

1.4.3. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE HER2. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA E HIBRIDACIÓN IN SITU

La sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento como la proteína HER2 relacionada con una amplificación del gen ERBB2 por parte de las células tumorales es conocida desde hace tiempo pero desde la aparición de fármacos diana, que han cambiado la evolución de estas pacientes, una correcta y fiable determinación del mismo es fundamental para obtener el mayor beneficio terapéutico. Alrededor de un 20% de los cáncer de mama al diagnóstico van a sobreexpresar HER2 por lo que un correcto método diagnóstico es mandatorio.

La técnica de elección es la IHQ combinada con las técnicas de HIS consiguiendo así detectar el mayor número de pacientes con sobreexpresión/amplificación de HER2. Para la determinación de HER2, igual que en el caso de los RH, se precisan unas condiciones de manipulación y conservación de la muestra.

En 2007, ASCO en colaboración con CAP publican las recomendaciones para la determinación de HER2 que serían actualizadas posteriormente en 2013^(18, 19).

1.- BIOPSIA: Se recomienda realizar la determinación de HER2 en la biopsia inicial y si el resultado es diagnóstico (positivo o negativo) no es necesario repetir la determinación. En algunos casos con resultado negativo en los que existe discordancia con el diagnóstico histológico y/ o la manipulación de la muestra no ha sido adecuada se recomienda realizar el estudio y sólo si éste es de nuevo negativo se podría plantear una tercera determinación en una nueva muestra.

2.- FIJADO: Al igual que en el caso de los RH, el fijado debe durar más de 6 horas y menos de 72 horas y se recomienda realizar el fijado en una solución neutra de formol al 10%. Posteriormente se recomienda realizar cortes en intervalos de 5-10 mm tras una inspección macroscópica completa. No deben emplearse secciones almacenadas más de 6 semanas para el estudio de HER2 mediante IHQ ni más de 6 meses para HIS.

3.- LABORATORIO: Para la determinación de HER2 mediante IHQ se recomienda el empleo de kits diagnósticos certificados por FDA y/o agencia europea, con previa validación en el laboratorio. Esta validación se podrá realizar con 25 casos positivos y negativos, validando los resultados con un centro de referencia. El uso de kits estandarizados requiere seguir estrictamente las instrucciones del fabricante, sin realizar variaciones.

El empleo de métodos no estandarizados exige una validación inicial más rigurosa. Se emplearán al menos 50 casos, la mitad de ellos inequívocamente positivos y la otra mitad negativos. La concordancia de los resultados con el centro de referencia debe ser al menos del 95%. Cualquier modificación al método debe ser de nuevo validada.

Se aconseja agrupar casos para realizar la prueba (al menos 4) para disponer de suficientes controles de líneas celulares del kit y para que los propios casos analizados nos puedan servir de control positivo. El número de pruebas considerado óptimo para garantizar la suficiencia técnica del laboratorio es de 250 casos/año.

Tras la realización del estudio de expresión de HER2 mediante IHQ se procede a la lectura de la intensidad de la expresión de HER2 en la membrana celular (Tabla 2).

Desde hace unos años, la determinación de HER2 mediante técnicas de HIS es el gold standard. Para la determinación de HER2 mediante técnicas de HIS se recomienda el empleo de kits diagnósticos certificados por FDA y/o agencia europea, con previa validación en el laboratorio al implementar la técnica. Esta validación se realiza con 25 casos positivos y negativos obteniendo una concordancia de al menos el 95% con un centro de referencia. Al igual que en el caso de la determinación IHQ, el uso de estos kits requiere seguir estrictamente las instrucciones del fabricante. Se recomienda el uso de kits que incluyan una sonda centromérica para detectar los carcinoma de mama polisómicos. El número de pruebas considerado óptimo para garantizar la suficiencia técnica del laboratorio es de 100 casos/año.

Existen varias casusas para rechazar los resultados de la determinación de HER 2 por IHQ o HIS:

- Cuando no se alcancen los requerimientos de calidad en el procesamiento de la muestra (fijación, corte, etc) recomendados.
- Resultados insatisfactorios en los controles.
- Ausencia de componente infiltrante en la muestra o presencia de escaso componente infiltrante difícilmente evaluable con el microscopio de fluorescencia (<20 células).
- Tinción intensa y extensa de membrana en ductos o acinos normales.

La estrategia recomendada es la determinación inicial de la expresión de HER2 utilizando métodos de IHQ y en los casos borderline (2+) o dudosos (por fallos en el proceso de conservación o procesamiento de la muestra) o en los estudios citológicos se recomienda completar el estudio con técnicas de HIS (Figura 5).

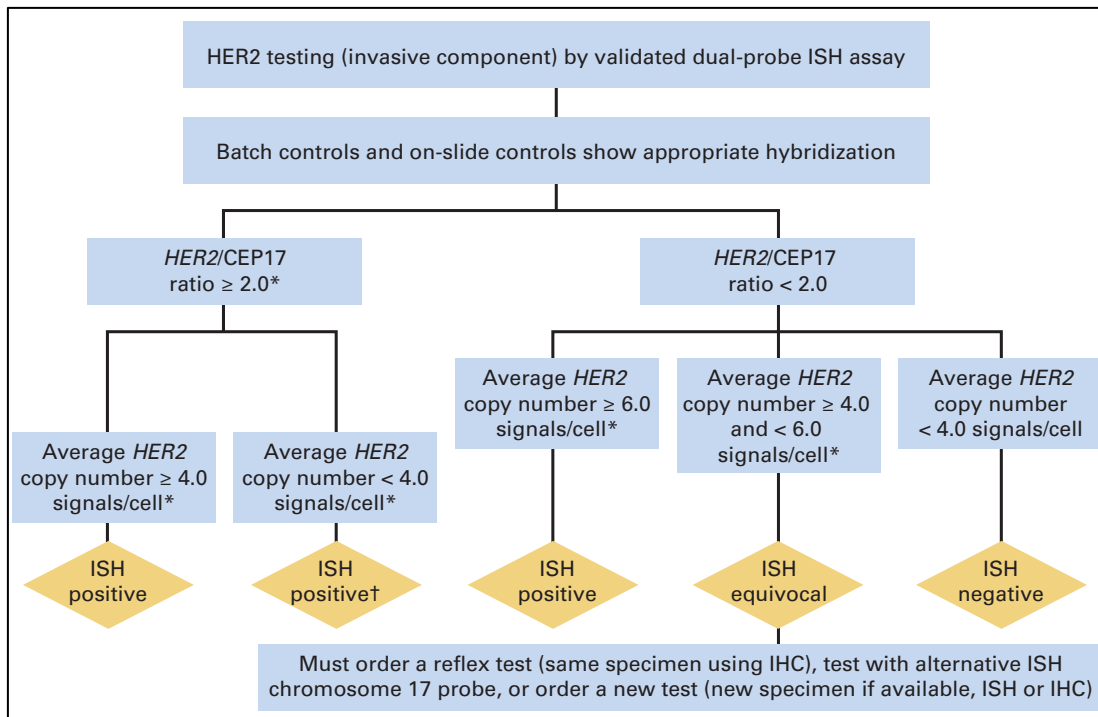


Figura 5. Algoritmo diagnóstico para la amplificación de HER2 mediante el empleo de técnicas de HIS con doble sonda. Fuente: Wolff AC et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. J Clin Oncol. 2013;31(31):3997-4013.

1.5. PLATAFORMAS GENÓMICAS

Una de las áreas de la medicina que más se beneficia del estudio del genoma es la oncología, especialmente para explicar la base biológica de la heterogeneidad del cáncer de mama.

Desde hace años se han ido conociendo cómo factores dependientes del tumor como su tamaño, afectación ganglionar, invasión linfovascular, características IHQ (expresión de RH, HER2, ki67, grado tumoral) y factores dependientes del paciente como la edad están directamente relacionados con el pronóstico. Actualmente las plataformas genómicas añaden información complementaria a estos parámetros clínicos y

patológicos. El empleo de las plataformas genómicas con fines pronósticos están aceptadas por ASCO y el grupo de expertos de St.Gallen⁽²⁰⁾ y se incluyen dentro de las guías NCCN⁽⁶⁾ (National Comprehensive Cancer Network) como un sistema de información que permite ayudar en la toma de decisiones terapéuticas en pacientes con tumores hormono-sensibles diagnosticados y operados en estadios iniciales (I-II).

Actualmente existen varias plataformas genómicas basadas en la expresión génica tumoral:

- 1.- MammaPrint®.**
- 2.- Oncotype DX®.**
- 3.- Prosigna®.**
- 4.- EndoPredict®.**

1.- **MammaPrint®** es la primera plataforma genómica desarrollada en este escenario. Se basa en el estudio de 70 genes y permite definir dos categorías de riesgo de recaída (alto y bajo) y clasificar a las pacientes con ganglios negativos en dos grupos pronóstico claramente definidos. Esto permite identificar un grupo de pacientes con excelente pronóstico que probablemente no se benefician de la quimioterapia. Las pacientes de bajo riesgo presentan una supervivencia global a los 10 años de 94,5% mientras que las de alto riesgo del 54,6%⁽²¹⁾.

Posteriormente estos datos fueron validados en dos estudios retrospectivos^(22, 23) y en un estudio prospectivo no randomizado⁽²⁴⁾ que apoyaron dichos resultados. El valor predictivo de MammaPrint® fue estudiado en un estudio retrospectivo con un amplio

número de pacientes (n=541) que sugiere que sólo las pacientes de alto riesgo se benefician del tratamiento con QT adyuvante⁽²⁵⁾. Por otro lado, MammaPrint aporta valor pronóstico en pacientes con ganglios positivos aunque la evidencia actual es aún limitada⁽²⁶⁾.

Cabe destacar que el grupo de pacientes incluidas en los estudios de validación de MammaPrint® no representa la mayoría de las pacientes con cáncer de mama en estadio iniciales y sus características no son homogéneas entre los distintos estudios ya que se incluyeron pacientes menores de 61 años en todos ellos, en uno de los estudios se incluyeron pacientes con 1-3 ganglios afectados⁽²²⁾ y en el estudio TRANSBIG⁽²³⁾ ningún paciente recibió QT adyuvante. Por lo tanto, serán los resultados del estudio prospectivo y aleatorizado MINDACT, aún pendiente de resultados, que compara MammaPrint® con factores clínico-patológicos convencionales para la selección de QT en pacientes con ganglios negativos o con 1-3 ganglios afectados los que permitirán definir la utilidad de MammaPrint® en este escenario⁽²⁷⁾.

2.- **Oncotype DX** ® se basa en el estudio de 21 genes y nos proporciona una puntuación de riesgo permitiendo clasificar en 3 categorías (alto, intermedio y bajo riesgo de recaída) a las pacientes con RE positivo y tumores en estadios iniciales intervenidas de cáncer de mama sin afectación ganglionar metastásica. En estudios iniciales, las pacientes clasificadas en riesgo bajo (score <18), medio (score 18-30) y alto (score ≥30) presentaron unas tasas de recurrencias a distancia a 10 años de 6,8%, 14,3% y 30,5%, respectivamente⁽²⁸⁾.

En estudios posteriores Oncotype DX ® ha demostrado tener capacidad predictiva de

beneficio de tratamiento adyuvante en este grupo de pacientes^(29, 30) y algunos estudios retrospectivos sugieren que podría tener también valor pronóstico y predictivo en pacientes postmenopáusicas con 1-3 ganglios afectados^(30, 31).

Por otro lado, mientras que Oncotype parecía ofrecer información pronóstica a largo plazo (más de 5 años), en base a los resultados del estudio NSABP-B14⁽³²⁾, los resultados no fueron los mismos en el estudio TransATAC⁽³³⁾. La validación prospectiva de estos resultados esta pendiente de publicación y los resultados se esperan para el año 2017 (Estudio TAILORx).

3.- **Prosigna®**. Este test se basa en la tecnología de la firma genómica PAM50 (Prediction Analysis of Microarray) que consiste en el estudio de 50 genes seleccionados a partir de un panel inicial de 534 genes mediante técnicas de microarrays y RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real). Aunque inicialmente la técnica empleada se basaba en el empleo de RT-PCR, en la actualidad existen plataformas genómicas más accesibles y rápidas que permiten estudiar este panel de 50 genes mediante el empleo de otras técnicas. En el caso Prosigna® este estudio genómico se realiza mediante tecnología Nanostring y el sistema de análisis nCounter⁽³⁴⁾(Figura 6).

Tras cuantificar la expresión de mRNA de estos 50 genes seleccionados clasifica los tumores en los subtipos intrínsecos moleculares (Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, Basal-like, Normal Breast-like). Además de la identificación del subtipo intrínseco, el test proporciona actualmente un ROR (Risk of Recurrence) score que se obtiene tras integrar en el mismo análisis el perfil intrínseco, el tamaño del tumor y el score de

proliferación. El valor de ROR junto con el estado ganglionar permite asignar a la paciente a una categoría de riesgo (baja, intermedia, alta) que se correlaciona con la probabilidad de recaída a distancia a 10 años.

Esta plataforma está validada en mujeres postmenopáusicas con tumores hormono-sensibles en estadios iniciales (incluso con 1-3 ganglios afectados) sometidos inicialmente a cirugía y tratados con terapia hormonal⁽³⁵⁻³⁹⁾.

Prosigna® está aprobado por FDA y la Unión Europea y en el consenso de St.Gallen de 2015 se pone de manifiesto su poder predictivo a largo plazo y su capacidad para detectar pacientes con bajo riesgo de recaída que no se benefician de realizar QT adyuvante.

Además, PAM50 se ha comparado con otras plataformas genómicas (Oncotype® y IHC4 assay) ,en un estudio con mas de 1000 pacientes, que mostró que en las pacientes hormono-sensibles y ganglios negativos, el ROR obtenido por PAM50 era más preciso que el obtenido por Oncotype® en la identificación de pacientes de alto riesgo ya que disminuía el porcentaje de pacientes de riesgo intermedio⁽³¹⁾.

Prosigna® ha permitido disponer de mayor accesibilidad al test genómico dado que puede realizarse en laboratorios locales aunque requiere un equipamiento de alto coste: Nanostring nCounter Dx Analysis System (Nanostring Technologies).

Por otro lado el valor de ROR establecido mediante PAM50 parece ser un factor

predictivo de beneficio de la terapia semanal con paclitaxel frente a la terapia trisemanal (en pacientes con bajo riesgo de recaída) según los resultados de un reciente estudio⁽⁴⁰⁾.

Existe otra plataforma (**Mammaprint /Blueprint®**) que permite definir los subtipos intrínsecos tumorales pero tras ser comparada con PAM50 sólo el 59% de las pacientes fueron clasificadas dentro del mismo subtipo tumoral con las dos plataformas genómicas por lo que las diferencias entre las diferentes metodologías deben ser comparadas en estudios prospectivos y a su vez comparadas con los métodos IHQ/FISH estándar para valorar dichos resultados⁽⁴¹⁾.

4.- **EndoPredict®**. Esta plataforma, disponible en Europa, con el estudio de 11 genes define dos categorías de riesgo en pacientes con tumores hormono-sensibles, con o sin afectación ganglionar, tratadas con QT y/o terapia hormonal. El grupo de mejor pronóstico a largo plazo probablemente no se beneficie de QT adyuvante⁽⁴²⁻⁴⁵⁾.

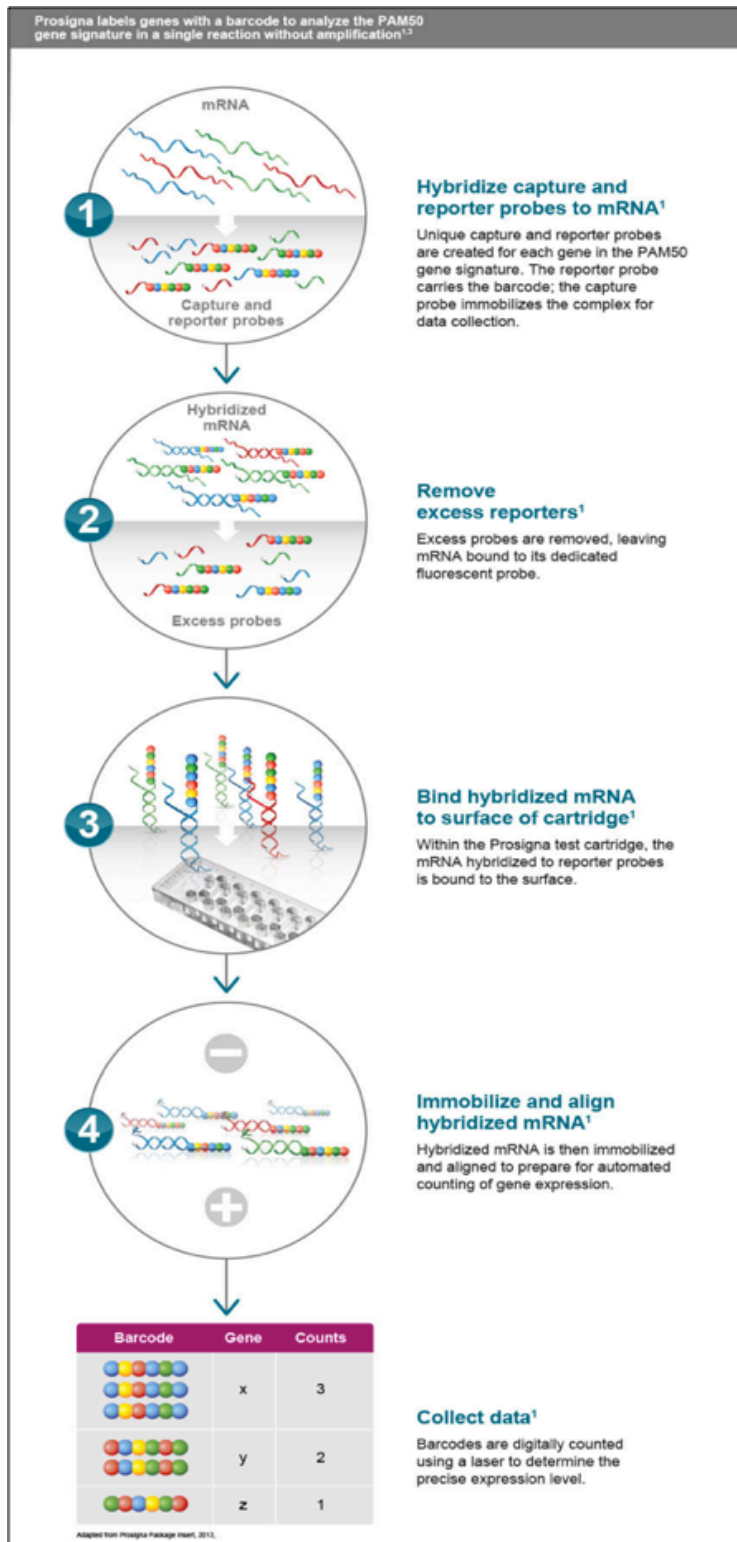


Figura 6. Tecnología nCounter empleada por la plataforma genómica Prosigna® para el estudio de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama. Fuente: Prosigna [Package Insert]. Seattle, WA: NanoString Technologies, Inc; 2013. Available from: <http://prosigna.com/overview/ncounter-digital-technology/>.

1.6. SUBTIPOS BIOLÓGICOS DEL CÁNCER DE MAMA

Los carcinomas de mama representan un grupo heterogéneo de tumores con distintos perfiles moleculares y composición celular. La clasificación histológica actual no refleja la heterogeneidad tumoral ni el comportamiento biológico y no permite definir factores predictivos de respuesta al tratamiento de quimioterapia o terapias biológicas.

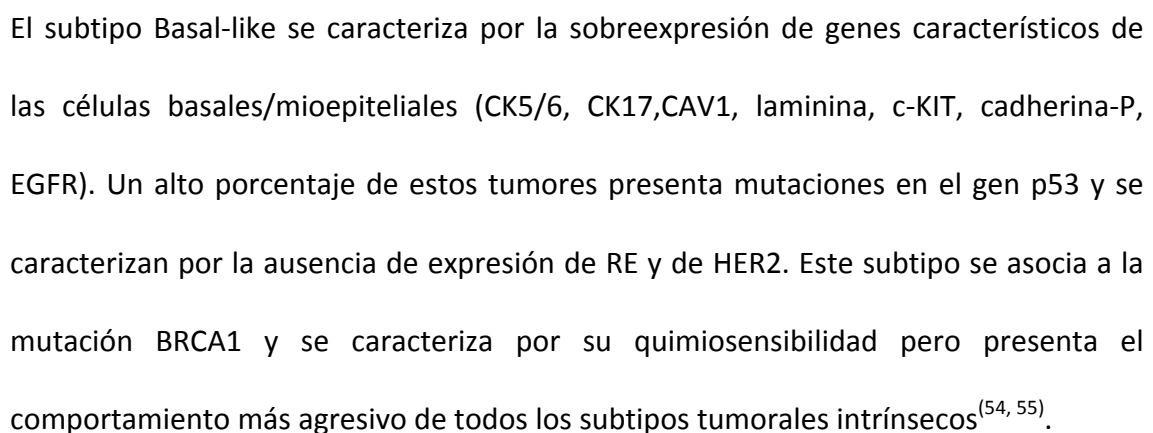
El empleo de técnicas de IHQ para definir características propias de cada tipo tumoral en función de la expresión de determinados marcadores en las células tumorales (RE, RP, ki67, HER2) es una técnica accesible y barata empleada de manera rutinaria en los hospitales. Las técnicas de biología molecular basadas en el estudio del genoma tumoral, aunque menos accesibles y con coste económico elevado, pueden definir los subtipos intrínsecos de cáncer de mama de mayor precisión pronóstica.

El estudio de genes tumorales mediante análisis de agrupamiento jerárquico en diferentes trabajos ha permitido definir perfiles genómicos con características biológicas similares, denominados perfiles intrínsecos de expresión (Figura 7), que han permitido a su vez individualizar el pronóstico y el tratamiento de los pacientes^(35, 46-53). Actualmente, basándonos en el perfil genómico, podemos clasificar los carcinomas de mama invasivos en cuatro subtipos intrínsecos: Luminal A , Luminal B, HER2-enriched, Basal-like y un subtipo denominado Normal Breast-like. Recientemente se ha definido un subtipo adicional, previamente englobado dentro de los tumores Basal-like, denominado Claudin-low (Tabla 6)⁽⁵³⁾.

Los carcinomas de mama de tipo Luminal A son el subtipo con mejor pronóstico y se caracterizan por expresar el gen del RE y genes relacionados (LIV1 y ciclina D1) y citoqueratinas de bajo peso molecular (CK7, CK8, CK18). Estos pacientes se benefician de tratamiento con terapia hormonal pero suelen mostrar menor beneficio de la quimioterapia. Suelen ser carcinomas ductales infiltrantes de grado 1-2, tubular, cribiforme o lobulillar.

Los tumores Luminal B se caracterizan por presentar marcadores luminales (citoqueratinas) pero con niveles moderados o bajos de RH y genes relacionados. Son tumores que presentan niveles elevados de índice de proliferación y pueden expresar genes propios de los subtipo basal y HER2. Suelen ser carcinomas ductal infiltrantes grado 2-3 con peor pronóstico que los tumores Luminal A. Al igual que los anteriores se benefician del tratamiento hormonal y presentan mayor beneficio del tratamiento con quimioterapia que los tumores Luminal A.

El carcinoma de mama HER2-enriched se caracteriza por presentar un aumento en la expresión del gen ERBB2 y genes del amplicón HER2 y se asocia a alteraciones de otros genes como topoisomerasa II alfa (topo2-alfa), GATA4, genes de angiogénesis y proteólisis y mutación de p53. Este subtipo tumoral muestra mejor respuesta y beneficio de la quimioterapia y al tratamiento con trastuzumab y su pronóstico es peor que aquellos tumores de subtipo Luminal A y B. Suelen ser carcinomas ductales de alto grado.



El subtipo definido mediante estudio genómico como Normal Breast-like es el menos frecuente y presenta características similares al tejido mamario normal con baja expresión de genes epiteliales luminales y expresión de genes característicos de células estromales. Este subtipo se asocia normalmente a escaso componente tumoral y alto componente estromal en la muestra lo cual dificulta su correcta clasificación y su existencia ha sido cuestionada en múltiples estudios postulándose que su origen podría ser fruto de un escaso volumen tumoral en la muestra analizada.

Finalmente, existe un subtipo tumoral que no fue descrito en la clasificación inicial sino posteriormente en el año 2007: el subtipo Claudin-low (bajo en claudina)^(53, 56).

El subtipo Claudin-low se sitúa junto al subtipo Basal-like en la agrupación jerárquica, lo que indica que ambas clases tumorales comparten algunas características genéticas (baja expresión de genes relacionados con HER2 y luminales) y se caracteriza por presentar una baja expresión de genes relacionados con las proteínas de adhesión intercelular uniones estrechas (claudinas 3, 4, 7, cingulina y ocludina) y del grupo de genes de adhesión celular (e- cadherina, una proteína de adhesión celular dependiente de calcio). Por otro lado, sobreexpresa un grupo de 40 genes relacionados con la respuesta del sistema inmune y presenta una baja expresión de genes relacionados con proliferación celular, a diferencia de los subtipos Luminal B, HER2-enriched y Basal-like, pero sobreexpresa un subgrupo de 80 genes estrechamente ligados con la diferenciación mesenquimal y la transición epitelio-mesénquima como el subtipo Normal Breast-like. Este tipo de tumores representan un grupo de tumores inicialmente incluidos dentro del subtipo Basal-like siendo tumores de mejor

pronóstico y evolución más lenta y una menor respuesta a quimioterapia que los tumores Basal-like.

Serie (referencia)	Número de tumores	Subgrupos moleculares (%)
Perou et al.2000	65	Luminal (58),HER2-enriched (11), Basal-like (13),Normal-like (18)
Sorlie et al.2001	78	Luminal A (38), Luminal B (6), Luminal C (12), HER2-enriched (13), Basal-like (16), Normal-like (15)
Sorlie et al.2003	115	Luminal A (36), Luminal B (14), HER2-enriched(14), Basal-like (24), Normal-like (12)
Sotiriou et al.2003	99	Luminal 1 (19), Luminal 2 (23), Luminal 3 (24), HER2-enriched (7), Basal-like (16), Normal-like (10)
Bertucci et al.2005	81	Luminal A (31), Luminal B (8), HER2-enriched (18), Basal-like (19), Normal (7)
Hu et al.2006	311	Luminal A (28), Luminal B (13), HER2-enriched (9), Basal-like (27), Normal-like (7)
Calza et al.2006	412	Luminal A (30), Luminal B (13), HER2-enriched (10), Basal-like (22), Normal-like (22)
Parker et al.2009	189	Luminal A (23), Luminal B (12), HER2-enriched (31), Basal-like (56), Normal-like(12)
Prat et al.2010	337	Luminal A (28-31), Luminal B (19-23), HER2-enriched (12-21), Basal-like (11-23), Claudin-low (7-14)

Tabla 6. Distribución de los subtipos moleculares de cáncer de mama en distintas series publicadas^(35, 46-53).

Estudios recientes nos están permitiendo conocer el grado de respuesta al tratamiento de estos subtipos intrínsecos ^(35, 53, 57-60), su pronóstico y su comportamiento en caso de recaída con aidez por diferentes localizaciones anatómicas en función del subtipo definido tras el estudio genómico tumoral^(61, 62) (Figura 8).

En los últimos años se ha estudiado la manera de diferenciar los subtipos intrínsecos mediante el empleo de técnicas más accesibles como la IHQ por lo que se han estudiado las características IHQ de estos subtipos tumorales intrínsecos^(63, 64).

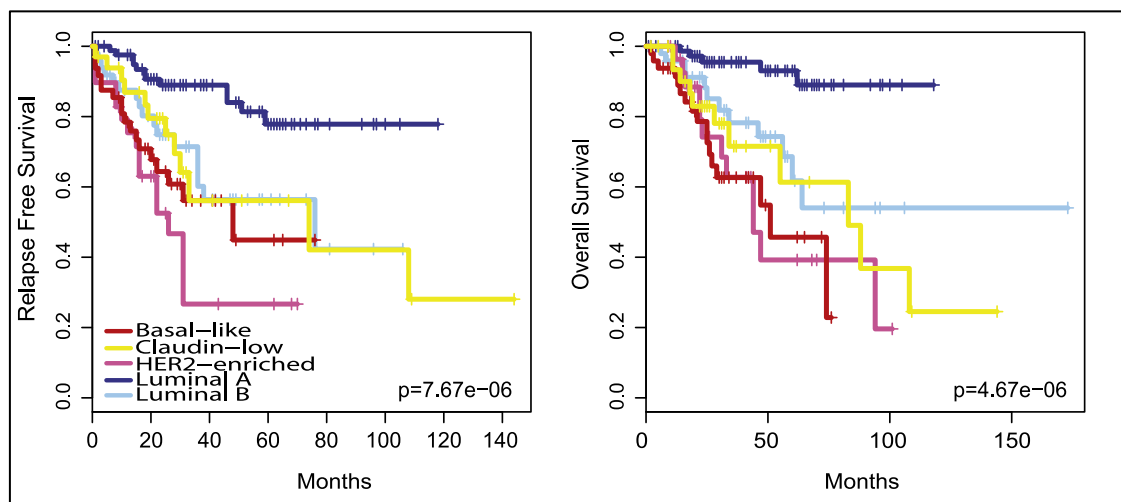


Figura 8. Curvas Kaplan-Meier de SLE y SG en función del subtipo intrínseco (Base de datos UNC337 excluyendo Normal Breast-like). Fuente: Prat A et al. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. Mol Oncol. 2011;5(1):5-23.

En base a los resultados del estudio de Cheang et al⁽⁶⁵⁾ publicado en 2009, que reveló el papel de ki67 y HER2 a la hora de identificar el subtipo intrínseco tumoral, en el año 2011 el grupo de expertos de St.Gallen propone una primera clasificación en subtipos definidos mediante los resultados IHQ de RE, RP, ki67, HER2 como subrogados de los subtipos intrínsecos definidos en los estudios del genoma tumoral⁽⁶⁶⁾.

En esta primera clasificación definieron 5 subtipos clínico patológicos (IHQ):

- “Luminal A “: RE y/o RP positivo ($\geq 1\%$), HER2 negativo y ki67 $<14\%$.
- “Luminal B HER2 negativo”: RE y/o RP positivo y ki67 $\geq 14\%$.
- “Luminal B HER2 positivo”: RE y/o RP positivo y HER2 positivo.

- “HER2 positivo”: HER2 positivo, RE y RP negativos.
- “Triple Negativo”: RE, RP y HER2 negativos.

Estas primeras definiciones histopatológicas de los subtipos intrínsecos son subóptimas como queda reflejado en el estudio de Prat et al ⁽⁶⁷⁾ publicado en 2013.

En la cohorte del estudio GEICAM 9906 analizada en este artículo, de los tumores con subtipo “Luminal A” un 52,3%, 30,3%, 12,7%, 0,7% son Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, Basal-like (PAM50).

Un 52% de tumores Luminal B (PAM50) se identifican como Subtipo-IHQ “Luminal A” y solo un 41,5% como “Luminal B”. Estos tumores Luminal B (PAM50) definidos como “Luminal A” presentaron peor supervivencia que los Luminal A (PAM50) identificados como subtipo-IHQ “Luminal A”. Con el fin de mejorar la capacidad diagnóstica de la IHQ sobre los tumores luminales, se estudió la importancia de la expresión en los RP y se definió un nuevo punto de corte empírico (≥ 20 % de células tumorales con expresión de RP), en lugar del umbral definido hasta entonces (≥ 1 % de núcleos celulares con inmunotinción nuclear), que clasifica los tumores luminales en dos grupos con diferente pronóstico (Luminal A-like y Luminal B-like), independiente de la administración de terapia endocrina. A pesar de que este hallazgo permite definir mejor a los pacientes con subtipo intrínseco Luminal B, hasta un 28,3% de éstos continúan siendo definidos como Luminal A-like y únicamente un 65,1% como Luminal B-like mediante IHQ cuando empleamos el nuevo valor umbral de RP, en este estudio.

En el consenso de St.Gallen 2013, en base a los resultados descritos anteriormente, se establecieron unos criterios para definir los 4 diferentes subtipos en base a los hallazgos de IHQ (RE,RP,HER2 y índice de proliferación ki67) ^(20, 68, 69) :

1.- Luminal A-like: Los tumores Luminal A-like son tumores que expresan RE y presentan niveles altos de expresión de RP ($RP \geq 20\%$) , bajo índice de proliferación ki67 ($ki67 < 14-20\%$) y no presentan sobreexpresión de HER2.

2.- Luminal B-like: Dentro de este grupo de tumores se definen 2 subgrupos:

- a. Luminal B-like y HER2 negativo: Son tumores que expresan positividad para los RE, no presentan sobreexpresión de HER2 y cumplen al menos una de las siguientes características: Baja expresión de RP (menor al 20%) , ki67 elevado (al menos del 14-20%) o alto riesgo de recurrencia en test genético.
- b. Luminal B-like y HER2 positivo: Son tumores con positividad en la expresión de RE y sobreexpresión de HER2 asociado a cualquier valor de ki67 o RP.

3.- HER2: Son tumores que presentan sobreexpresión de HER2 y negatividad en la expresión de RH (RE y RP).

4.- Triple negativo: Los tumores Triple Negativo se caracterizan por presentar negatividad de los RE, RP y HER2 mediante técnicas de IHQ.

Dado que actualmente en la mayoría de los centros no se dispone de la posibilidad de realizar el estudio molecular del tumor, se realiza una aproximación a esta clasificación genómica mediante el empleo de marcadores IHQ.

Recientemente, Prat et al⁽⁷⁰⁾ han publicado un análisis conjunto de los resultados de múltiples estudios que evalúan la concordancia entre el subtipo-IHQ (St.Gallen 2013) y el subtipo genómico. Según los resultados de este estudio, uno de cada tres pacientes presentan discordancia entre ambos subtipos presentando una concordancia moderada (Índice kappa=0, 564). Este grado de concordancia depende del subtipo-IHQ, siendo mayor para los tumores Basal-like (Tabla 7).

Esta nueva clasificación mejora la concordancia en los tumores Luminal A y B pero aún es subóptima en todos los subtipos intrínsecos cuando la comparamos con datos de expresión genómica.

	N	Luminal A	Luminal B	HER2-Enriched	Basal-like
Luminal A-like	637	62,2%	27%	10,2%	0,6%
Luminal B-like	317	34,1%	51,1%	11%	3,8%
Luminal B-like HER2+	182	33%	46,2%	18,7%	2,2%
HER2	168	19%	4,2%	66,1%	10,7%
Triple Negativo	868	1,6%	3,2%	9,1%	86,1%

Tabla 7. Concordancia entre el subtipo intrínseco (PAM50) y el subtipo definido mediante IHQ de acuerdo con el Consenso de St.Gallen 2013. Adaptada de: Prat A et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. Breast. 2015.

1.7. QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE

La QT neoadyuvante consiste en el empleo de agentes citotóxicos previo a la realización de la cirugía mamaria con fines curativos y es el tratamiento estándar en el cáncer de mama localmente avanzado. El objetivo fundamental de este tratamiento es mejorar la tasa de cirugías conservadoras, disminuir el volumen tumoral y controlar la enfermedad micrometastásica. A su vez, el empleo de QT neoadyuvante permite valorar la sensibilidad al tratamiento e identificar marcadores biológicos predictivos de respuesta al mismo. Aunque actualmente no existen estudios que avalen un beneficio en supervivencia respecto al empleo de QT adyuvante, en 2007 se publicó un metaanálisis en el que se incluían 14 estudios con 5.500 pacientes, en el que se observó que aunque no había beneficio en supervivencia entre los esquemas neoadyuvante/adyuvante, se objetivó un menor porcentaje de mastectomías (RR = 0,71; IC: 95%, 0,67-0,75) sin empeorar el control local (HR = 1,12; IC:95%, 0,92-1,37) en el grupo tratado con QT neoadyuvante⁽⁷¹⁾.

La QT neoadyuvante está indicada en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado irresecable (Estadio III), en pacientes con enfermedad resecable (Estadios I y II) con intención de facilitar la cirugía conservadora o en pacientes con tumores que presentan alta tasa de respuesta a la QT (tumores con sobreexpresión de HER2 y tumores Triple Negativo) .

No existe un régimen de QT estándar pero el régimen empleado generalmente suele incluir antraciclinas y taxanos ya que este tratamiento ha demostrado ofrecer altas tasa de respuesta⁽⁷²⁻⁸⁴⁾.

En los tumores que presentan sobreexpresión de HER2, candidatos a QT neoadyuvante, desde el año 2010 sabemos que asociar tratamiento con trastuzumab ha demostrado aumentar la tasa de respuestas y la supervivencia en estas pacientes^(15, 16, 85-87).

Recientemente en el estudio Neosphere, se evaluó el papel del doble bloqueo de HER2 con trastuzumab y pertuzumab asociado a tratamiento con taxanos frente al tratamiento con trastuzumab y taxanos. La tasa de respuesta completa patológica (pCR) fue mayor en la rama del doble bloqueo presentando una pCR de 45,8% frente al del 29% ($p = 0,031$)⁽⁸⁸⁾.

En este tipo de tumores, otros esquemas que no incluyen antraciclinas han demostrado altas tasas de respuesta en combinación con trastuzumab⁽⁸⁹⁾.

Además, el empleo de QT neoadyuvante nos ha permitido conocer que los distintos subtipos moleculares presentan diferentes perfiles de respuesta a la QT. Se ha observado que las pacientes con subtipo Basal-like y HER2-enriched presentan mayores tasas de pCR con la QT neoadyuvante comparados con el subtipo Luminal A, mientras que los tumores subtipo Luminal B se asocian a una respuesta intermedia a la terapia neoadyuvante^(59, 60, 90-94).

1.8. MEDICIÓN DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO

1.8.1. EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA RESPUESTA TUMORAL

Conseguir una adecuada respuesta del tumor primario es el objetivo principal del tratamiento neoadyuvante, con el fin de aumentar la tasa de cirugías conservadoras, por lo que es necesario realizar una correcta evaluación inicial que debe incluir la exploración física, mamografía y ecografía inicial. La Resonancia Magnética debe valorarse en pacientes portadoras de la mutación BRCA, portadoras de prótesis mamarias, carcinomas lobulillares, sospecha de tumores multifocales o tumores multicéntricos, o en casos que precisen definir mejor tumoración primaria. Estas pruebas se repetirán al finalizar el tratamiento de quimioterapia, previamente a la cirugía, y permitirán identificar qué pacientes son subsidiarias de cirugía conservadora⁽⁹⁵⁾.

La colocación de un clip en el lugar de la biopsia pre-tratamiento es fundamental dado que hasta un 20% de las pacientes pueden desarrollar una respuesta patológica completa y permite facilitar la cirugía mamaria para identificar la presencia de tumor residual.

1.8.2. EVALUACIÓN PATOLÓGICA DE LA RESPUESTA TUMORAL

En los últimos años, en base a la importancia de la respuesta patológica al tratamiento y su relación directa con la supervivencia, se han desarrollado diferentes métodos

anatomo-patológicos estandarizados de medición de dicha respuesta.

Los más empleados son:

- 1.- La clasificación de Miller & Payne.
- 2.- La clasificación de Symmans.

1.8.2a. CLASIFICACIÓN DE MILLER & PAYNE

La respuesta clínica y patológica tiene implicaciones pronósticas pero la mayoría de los pacientes no presentan una respuesta completa al tratamiento por lo que es necesario disponer de sistemas de medida de respuesta adecuados.

Esta clasificación divide la respuesta tumoral en cinco grados de respuesta atendiendo a la reducción en la celularidad maligna en el tumor antes y después del tratamiento:

- Grado 1: No hay una reducción en el número de células tumorales.
- Grado 2: Hay una mínima reducción en el número de células cancerosas (hasta un 30%).
- Grado 3: Se produce una reducción en el número de células tumorales de un 30-90%.
- Grado 4: La reducción en el número de células tumorales es de más del 90%.
- Grado 5: Hay una respuesta patológica completa y por tanto no hay presencia de tumor residual.

Este sistema de gradación puede predecir la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado tratados con

quimioterapia y por lo tanto, ha demostrado ser un factor pronóstico independiente en este subgrupo de pacientes⁽⁹⁶⁾.

1.8.2b. CLASIFICACIÓN RCB (RESIDUAL CANCER BURDEN) DE SYMMANS

Esta clasificación valora la respuesta al tratamiento neoadyuvante midiendo la carga de tumor residual (RCB) mediante el empleo de una fórmula matemática utilizando los siguientes parámetros⁽⁹⁷⁾ (Figura 9):

- 1.- Fracción de celularidad cancerosa invasiva (f_{inv})
- 2.- Diámetro del tumor primario (d_{prim})
- 3.- Número de metástasis ganglionar (LN)
- 4.- Diámetro de la metástasis más grande (met)

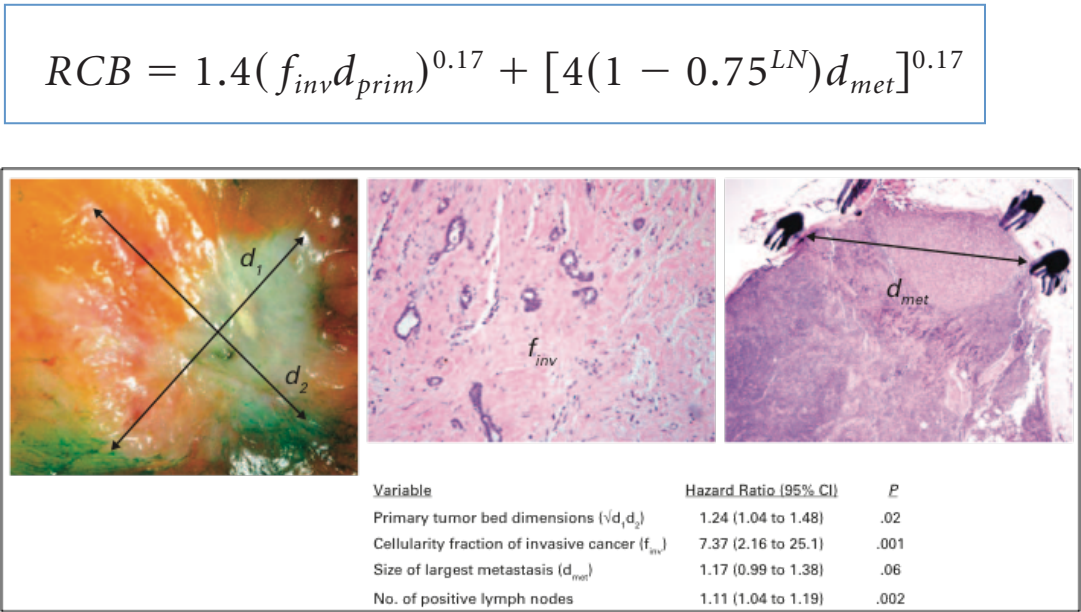


Figura 9. Variables patológicas del tumor primario y ganglionares incluidas la determinación de la respuesta tumoral mediante la clasificación de RCB de Symmans. Fuente: Symmans WF et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. J Clin Oncol. 2007;25(28):4414-22.

Esta puntuación es una variable continua que puede dividirse en 4 categorías con diferente pronóstico: RCB-0, RCB-I, RCB-II y RCB-III (Figura 10). Las pacientes con RCB-III presentan peor supervivencia libre de enfermedad a 5 años (un 48,2% menos) que aquellas pacientes con RCB-0.

La primera categoría (RCB-0) comprende aquellos tumores que presentan pCR. El punto de corte que divide las categorías RCB-I y RCB-II es 1.36 y el punto de corte entre las categorías RCB-II y RCB-III es 3.28.

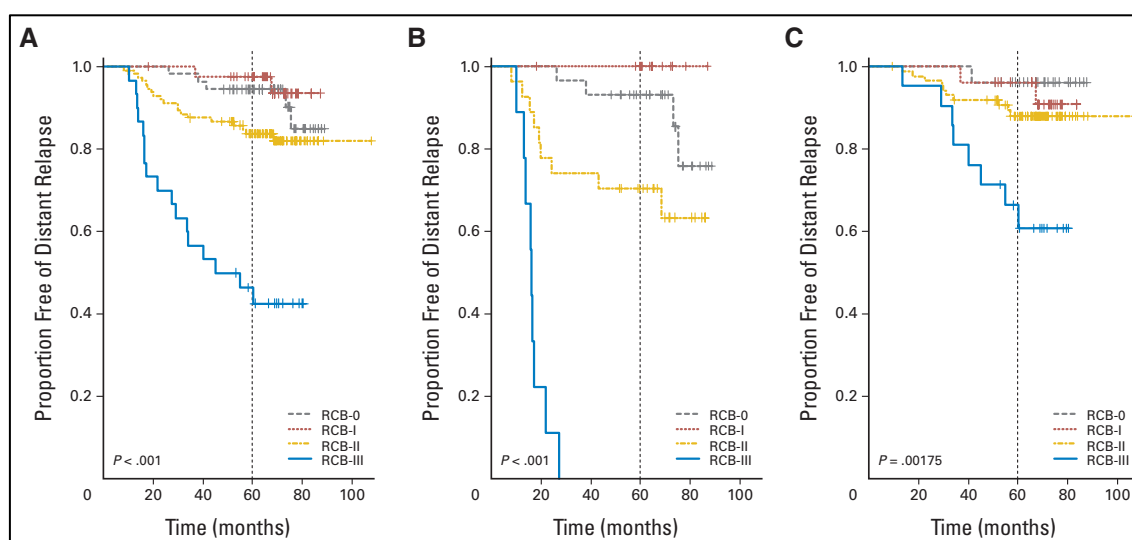


Figura 10. Curvas de Kaplan-Meier de las 4 categorías de respuesta medida mediante la clasificación de RCB. A: incluye una cohorte de pacientes tratadas con paclitaxel seguidas de 5-fluorouracilo, adriamicina y ciclofosfamida. B: incluye un subgrupo, de la cohorte anterior, de pacientes no tratadas con hormonoterapia, en adyuvancia. C: representa el subgrupo de pacientes tratadas con hormonoterapia en adyuvancia. Fuente: Symmans WF et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. J Clin Oncol. 2007;25(28):4414-22.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....

2.1. HIPÓTESIS

Las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado reciben tratamiento con QT neoadyuvante tras la confirmación histológica en la biopsia inicial. Se realiza determinación IHQ de RE, RP, ki67 y determinación de HER2 mediante IHQ y/o FISH en la biopsia y en la pieza quirúrgica. En función de los resultados de dichos marcadores se define un subtipo-IHQ tumoral subrogado del subtipo intrínseco definido mediante estudio genómico (PAM50).

Las hipótesis en las que se basa el trabajo son:

- 1.- Existen cambios clínicamente significativos en las determinaciones de RE, RP y ki67, cuantificados mediante técnicas de IHQ, tras el tratamiento de QT neoadyuvante.
- 2.- Existen cambios clínicamente significativos en el estatus de HER2, determinado mediante IHQ y/o FISH, entre la biopsia por trucut y la pieza quirúrgica tras el tratamiento de QT neoadyuvante.
- 3.- El subtipo-IHQ definido en base a los criterios de St.Gallen 2013 y el subtipo intrínseco definido mediante PAM50 no pueden emplearse indistintamente ya que presentan moderado grado de concordancia.

2.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Los objetivos del estudio son los siguientes:

- 1.- Valorar el cambio en el perfil IHQ (expresión de RE, RP, HER2 y Ki67) de las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado tras el tratamiento con QT neoadyuvante.
- 2.- Identificar si este cambio de perfil tumoral podría desencadenar cambios en la decisión terapéutica respecto al empleo de hormonoterapia, terapia anti-HER2 (trastuzumab) o quimioterapia.
- 4.- Conocer las características clinicopatológicas de nuestra serie.
- 5.- Conocer a su vez la distribución por subtipos-IHQ en las dos muestras (biopsia y espécimen quirúrgico) y los porcentajes de cambio de dichos subtipos analizando las causas del cambio.
- 6.- Bajo el supuesto de que no existe un cambio en la biología tumoral tras el tratamiento con QT neoadyuvante, valorar la concordancia entre el subtipo intrínseco definido mediante el empleo de la plataforma genómica PAM50 (realizado sobre la biopsia por trucut) y el subtipo subrogado definido mediante los resultados de IHQ (Subtipo-IHQ) en la biopsia por trucut y el espécimen quirúrgico.

7.- Generar un subtipo-IHQ al que denominaremos “subtipo-IHQ compuesto” basado en la expresión de RH, HER2 y ki67 en las dos muestras tumorales, es decir, estableciendo como referencia la expresión mayor de las dos medidas (biopsia por trucut o pieza quirúrgica), reflejo de la práctica habitual para la toma de decisiones terapéuticas. Valorar la concordancia de este subtipo con el subtipo genómico definido mediante PAM50 y por último, valorar su utilidad en la práctica clínica.

8.- Estudiar la validez, seguridad y eficacia de la IHQ como prueba diagnóstica para definir los subtipos intrínsecos de cáncer de mama.

9.- Valorar si los subtipos-IHQ y los subtipos intrínsecos de la biopsia trucut son predictores de respuesta al tratamiento.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. SUJETOS DEL ESTUDIO

Para nuestro estudio se seleccionó un subgrupo de 179 pacientes de las 226 registradas en un ensayo clínico fase II que cumplen los siguientes criterios:

- Disponer de estudio completo mediante técnicas de IHQ de la cuantificación (medida en % de expresión) de RE, RP y índice ki67 en la biopsia por trucut y pieza quirúrgica (en aquellas pacientes con persistencia tumoral tras la QT neoadyuvante).
- Disponer de estudio concluyente de HER2 mediante IHQ y/o FISH en la biopsia por trucut y en la pieza quirúrgica (en aquellas pacientes con persistencia tumoral tras la QT neoadyuvante).

3.2. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO CLÍNICO

Se trata de un ensayo prospectivo experimental aleatorizado y randomizado desarrollado con el objeto de evaluar los factores predictivos de respuesta al tratamiento de quimioterapia en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado.

El ensayo clínico fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del hospital Clínico San Carlos (número de registro CEIC 05/117) y registrado en la web <http://clinicaltrials.gov> con el código NCT 00123929.

El período de inclusión de pacientes en el ensayo clínico fue desde Junio de 2005 hasta

Mayo de 2009. Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado antes de ser incluidas en el ensayo clínico y tras completarse dicho período 226 pacientes fueron registradas en el estudio.

Los criterios de inclusión del el ensayo clínico son:

- 1.- Edad comprendida entre los 18 y 75 años.
- 2.- Ser diagnosticada de cáncer de mama localmente avanzado, cáncer de mama inoperable o cáncer de mama estadio II no subsidiario de cirugía conservadora.

Los criterios de exclusión del ensayo clínico son:

- 1.- Detección de hiperbilirrubinemia en los estudios analíticos previos a la inclusión en el ensayo clínico.
- 2.- Insuficiencia cardiaca descrita como fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) menor al 50%..
- 3.- Edad superior a los 75 años.

El objetivo primario del estudio era definir factores predictores de respuesta a taxanos y antraciclinas, por lo que se compara el tratamiento con dichos fármacos administrados en monoterapia. Para ello se incluyeron pacientes con cáncer de mama localmente avanzado y se aleatorizaron a recibir tratamiento con cuatro ciclos de docetaxel 100 mg/m^2 cada 3 semanas con soporte de factores estimulantes de las colonias de granulocitos cada 21 días frente a cuatro ciclos de tratamiento con adriamicina 75 mg/m^2 cada 3 semanas. La aleatorización se realizó mediante un programa informático de generación aleatoria de números, desde la unidad de

protocolización del Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico San Carlos.

Tras haber recibido cuatro ciclos de QT se revaluó la enfermedad y las candidatas a cirugía fueron intervenidas en el Servicio de Ginecología del Hospital Clínico San Carlos según los criterios definidos por el Comité multidisciplinar de Cáncer de Mama de dicho centro.

La respuesta patológica tumoral se evaluó mediante dos sistemas de evaluación diferentes: la clasificación de RCB (Residual Cancer Burden) de Symmans y clasificación de Miller & Payne. Esta primera clasificación establece 4 categorías de respuesta patológica como se ha descrito anteriormente y se consideró buena respuesta patológica a las categorías 0 (pCR) y I.

El tratamiento de QT, RT u hormonoterapia tras la cirugía fue determinado a criterio de su oncólogo médico. La mayoría de las pacientes recibieron tras la cirugía el esquema de quimioterapia que no recibieron previamente, asociado o seguido de trastuzumab, RT y terapia hormonal en función las características IHQ tumorales de cada paciente.

Los resultados iniciales de este estudio, cuyo objetivo era definir factores predictores de respuesta a docetaxel y adriamicina, fueron objeto de un Abstract publicado en ASCO Annual Meeting en 2010 y fueron los siguientes⁽⁹⁸⁾:

Se incluyeron en el análisis 204 pacientes de las 226 pacientes registradas inicialmente (104 tratadas con adriamicina y 100 tratadas con docetaxel). La tasa de respuesta

patológica fue similar en las dos ramas de tratamiento siendo del 19% en la rama de adriamicina vs 20% en la de docetaxel ($p = 1.0$).

En el análisis multivariante, la alta expresión de topo2-alfa y los tumores RE positivo presentaron peor respuesta a adriamicina y los tumores RE positivo y con tamaño tumoral superior a 5 cm peor respuesta a docetaxel.

El estudio del perfiles genómicos fue posible en 94 pacientes observándose que los tumores Basal-like fueron más sensibles selectivamente a docetaxel y resistentes a adriamicina. No se observaron diferencias significativas en otros subtipos (Tabla 8).

Genomic subtype	Good PatRes (PCR+I)			RCB (mean)		
	ADR	DOC	P*	ADR	DOC	P*
Luminal A	1/12 (8%)	0/5 (0%)	NS	3.386	2.839	NS
Luminal B	2/14 (14%)	0/11 (0%)	NS	2.378	2.806	NS
HER2-enriched	1/5 (20%)	2/5 (40%)	NS	2.822	1.670	NS
Basal	0/7 (0%)	5/9 (56%)	0.034	3.245	1.626	0.039
Claudin low	3/12 (25%)	1/5 (20%)	NS	2.626	2.538	NS
Normal	1/4 (25%)	2/5 (40%)	NS	2.183	2.821	NS

Tabla 8. Porcentaje de buena respuesta patológica (RCB 0 y I) y RCB media en función del subtipo intrínseco y tipo de QT administrada (adriamicina/docetaxel). Fuente: Martin M et al.. Molecular and genomic predictors of response to single-agent doxorubicin (ADR) versus single-agent docetaxel (DOC) in primary breast cancer (PBC). J Clin Oncol 2010;28:15s, 2010 (suppl; abstr 502).

Posteriormente, en el año 2011, se publicaron los resultados de un subanálisis del estudio sobre la correlación entre las distintas técnicas de medición de la expresión de topo2-alfa en 61 muestras de tumor de pacientes incluidas en este ensayo clínico⁽⁹⁹⁾.

Topo2-alfa se determinó mediante RT-PCR, microarrays de DNA, IHQ y FISH y se compararon los resultados con las características clínico-patológicas y el subtipo intrínseco de cáncer de mama. Se observó una importante correlación entre los resultados obtenidos mediante PCR y microarrays de DNA y de ambos con el resultado medido mediante IHQ. Sin embargo, se observó un bajo grado de concordancia entre el resultado obtenido con IHQ y FISH. Además, se observó una mayor expresión de topo2-alfa (determinada mediante PCR, microarrays o IHQ) en los subtipos intrínsecos asociados a un mayor índice de proliferación (Luminal B, HER2-enriched y Basal-like) y la expresión de topo2-alfa (determinada mediante PCR o microarrays) se asoció a niveles elevados de ki67. Este estudio refleja la importancia de la técnica de medición de topo2-alfa como parámetro predictivo de respuesta a antraciclinas en futuros estudios.

En 2012 se publicó otro subanálisis que evaluaba el valor predictivo de respuesta a docetaxel o adriamicina de los polimorfismos de la enzima GST (Glutation S-transferasa)⁽¹⁰⁰⁾. Se realizó estudio de dichos polimorfismos mediante RT-PCR (GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1) en 159 pacientes y determinación del subtipo intrínseco en 57 pacientes. Se observó que los pacientes homocigotos GG para GSTP1 c313A>G presentaron menor resistencia a la QT con adriamicina y que la expresión de GSTP1 varía de manera significativa entre los distintos subtipos intrínsecos.

3.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL TUMOR

3.3.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se realizó estudio histológico inicial en todas las pacientes mediante biopsia por trucut y tanto las muestras obtenidas de la biopsia por trucut como los especímenes quirúrgicos de las pacientes fueron identificadas por un código único, garantizándose la confidencialidad de los datos de las enfermas de acuerdo con los requerimientos de la ley 15/99 de Protección de Datos de Carácter Personal. Las piezas quirúrgicas se estudiaron en un laboratorio centralizado (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca).

El procedimiento de obtención de muestra inicial consistía en una biopsia por trucut del tumor primario de mama que se realizó en el servicio de Oncología del Hospital Clínico San Carlos. La biopsia se extrajo previamente al inicio de QT neoadyuvante y para comprobar su celularidad se realizó un estudio inicial mediante técnica de hematoxilina y eosina empleándose únicamente las muestras que presentaron más de un 80% de celularidad. En las pacientes con tumores superficiales se realizó biopsia incisional.

Una parte de la muestra se procesó para estudio histológico por parte del servicio de Anatomía Patológica previa conservación en una solución neutra de formalina. La otra parte de la muestra se incluyó en una solución estabilizadora y se congeló a -70°C con

el objeto de realizar estudios sobre el DNA tumoral. Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado aceptando la extracción y estudio de su DNA dentro del protocolo del estudio.

Para la extracción del RNA se emplearon muestras de tejido tumoral (procedentes de la biopsia tumoral) congeladas y se empleó un kit (Qiagen RNeasy Mini Kit; Qiagen Inc, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante y modificando los primeros pasos del proceso al observar que de esta manera se obtenía mayor rendimiento del proceso.

Los pasos iniciales que se modificaron del protocolo del fabricante fueron los siguientes:

- 1.- Homogeneización de la muestra (1-5mg) con el homogeneizador Ultra Turrax T8(S8N-5G) durante 40 segundos en 1 ml de Invitrogen®, en hielo .
- 2.- Incubación de la muestra a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- 3.- Añadir a la mezcla 0,4 ml de cloroformo y agitar durante 10 minutos.
- 4.- Centrifugar durante 15 minutos a una velocidad de 14.000 rpm.
- 5.- Extraer la fase acuosa con una pipeta y añadir a un volumen de etanol al 70%.

Tras la extracción de RNA purificado de cada muestra se almacenó a -80º C en una solución de agua libre de RNAsas con el fin de mantener una correcta conservación de la muestra. La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó mediante el empleo de espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000 UV Spectrophotometer; Thermo Fisher

Scientific, Wilmington, DE). Posteriormente se valoró la integridad del RNA empleando el RNA 6000 Nano Chip kit.

Para el estudio genómico tumoral se obtuvo cDNA a partir del RNA extraído mediante la acción de una enzima retrotranscriptasa empleando el Kit SuperScript First-Strand Síntesis for RT-PCR Invitrogen®. Para comprobar que el cDNA había sido correctamente sintetizado, el primer cDNA obtenido fue amplificado mediante el empleo de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional como se describe en el artículo de Krauzer et al⁽¹⁰¹⁾.

3.3.2. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA Y ESTUDIO DE LA AMPLIFICACIÓN DE HER2 POR FISH (Hibridación fluorescente in situ)

Las muestras obtenidas de la biopsia por trucut (n=179) y el espécimen quirúrgico (n=158) fueron incluidos en parafina según los criterios del centro. Todos los estudios de IHQ fueron realizados como parte del trabajo rutinario de los departamentos de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos. Tras realizar el corte en secciones de 4 microm y someter las muestras a un proceso de desparafinación e hidratación se procedió al estudio IHQ. Los marcadores IHQ se determinaron mediante anticuerpos monoclonales y con el sistema de detección provisto por el fabricante. Se realizaron las siguientes determinaciones inmunohistoquímicas en las biopsias por trucut: RE, RP, HER2, Ki67, topo2-alfa, tau, p27, bcl-2, EGFR, y CK 5/6. El estudio de amplificación de HER2 y topo2-alfa se cuantificó mediante el empleo de técnicas de HIS .

Se emplearon cortes de muestras conservadas en parafina para el estudio de RE (clone 1D5, 1:35; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), RP (clone PgR 636, 1:50; Dako Cytomation), ki67 (clone MIB-1, 1:75; Dako Cytomation) y HER2 (HercepTest DAKO®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tras la incubación con los distintos anticuerpos monoclonales, los estudios IHQ se realizaron empleando el sistema de inmunotinción Bond-max (Vision BioSystems, Hingham, MA).

La determinación de la amplificación de HER2 se cuantificó mediante FISH sobre los cortes de las muestras que se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante para las muestras conservadas en parafina. Las sondas empleadas fueron la sonda centromérica 17 (CEP17) etiquetada en verde y la sonda ERBB2 locus-específica etiquetada en naranja (Vysis-Abbot, Downers Grove, IL). Se contabilizaron un mínimo de 100 núcleos por caso y las imágenes fueron examinadas en el microscopio electrónico y capturadas para su estudio (MetaSystems, Altlussheim, Germany).

Los resultados de RE y RP fueron considerados positivos, en el informe estándar, cuando se informó inmunotinción nuclear en $\geq 1\%$ de las células tumorales y negativos cuando la tinción nuclear fue inferior al 1% de las células.

Además, siguiendo los criterios de St.Gallen 2013⁽⁶⁸⁾ :

- Clasificamos en dos categorías los valores RP. Consideramos que existe un alto nivel de expresión de RP si su valor es $\geq 20\%$ y un bajo nivel de expresión de RP si su valor de expresión es $< 20\%$.
- Se consideró también como valor umbral de ki67 el 20%, en lugar de otros valores

umbral más bajos, para definir dos categorías con alto/bajo nivel de expresión debido a que la tinción en los controles de tejido mamario normal (del banco de tejidos del Hospital Clínico San Carlos) fue siempre inferior a dicho valor.

Los informes de los resultados de expresión de HER2 se basaron en las recomendaciones vigentes en el período en que fueron estudiadas las pacientes. Los criterios de medición de expresión de HER2 mediante IHQ fueron los siguientes:

- Resultado negativo: 0+ : ausencia de tinción de membrana o tinción en menos del 10% de las células y 1+ : tinción de la membrana incompleta y ligera en más del 10% de las células tumorales.
- Resultado positivo: 3+: tinción de la membrana completa intensa en más del 10% de las células tumorales.
- En los casos dudosos (2+) se completó estudio mediante el empleo de FISH.

Cuando se emplearon técnicas de FISH, se consideró el resultado de la hibridación HER2 positivo cuando la razón ERBB2/CEP17 fue $\geq 2,2$.

3.3.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS TUMORES MEDIANTE MICROARRAYS. CLASIFICACIÓN EN SUBTIPOS INTRÍNSECOS

El estudio de microarrays se realizó en Lineberger Comprehensive Cancer Center de la Universidad de Carolina del Norte dirigido por Charles M. Perou.

Los microarrays de DNA son superficies sólidas a la cual se une una colección de

fragmentos de DNA que representan determinados genes. Su funcionamiento consiste en medir la hibridación entre la sonda específica fijada a la superficie sólida y la molécula diana. Este método de estudio genómico permite estudiar miles de genes utilizando simultáneamente una muestra de referencia (RNA de referencia) que hibridará con los microarrays de manera competitiva con el RNA objeto de estudio. En este ensayo clínico se utilizó la técnica de microarrays empleando los microarrays “Whole Human Genoma Oligo Microarray 4x44K” comercializado por Agilent®. Esta plataforma de microarrays esta formada por 44.000 sondas de las cuales 41.000 son sondas de genes humanos y las 3.000 restantes se emplean como sondas de control. El RNA de referencia empleado en nuestro estudio contiene RNA de tejido mamario sano procedente de 3 líneas celulares de tejido mamario (SUM 149 MCF-7, SUM 102) .

Para poder realizar el estudio genómico de la muestra tumoral en primer lugar se extrajo cRNA procedente de la retrotranscripción de cDNA tumoral y posteriormente se realizó la amplificación del RNA mediante el empleo del “Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit” de Agilent®. En todas las muestras la cantidad de RNA de partida fue la misma (2,5ug). El marcaje del cRNA tumoral se realizó con el fluorocromo Cy3-CTP¹¹ y el del cRNA de referencia con Cy5-CTP¹². Tras la amplificación del RNA se midió su concentración en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. Tras la cuantificación de la concentración de RNA (ug/ul), la concentración de cianina 3 y cianina 5 (pmol/ul) se desecharon aquellas muestras que presentaban una concentración de RNA menor a 0,95ug/l y las muestras con una actividad baja de cianina (menor de 8pmol de cianina por cada ug de RNA).

Este cRNA marcado fue el empleado para hibridar con las sondas de microarrays.

Antes de la hibridación se mezcla el cRNA tumoral con el cRNA de referencia que se unirá de manera competitiva a los microarrays.

Tras la hibridación se realizó el escaneado de los datos, que se basa en la detección de fluorescencia emitida, empleando un scanner (GenePix 4000B scanner; Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). El escaneado proporciona una imagen pixelada que permite medir la intensidad de cada punto del microarray empleando el programa Gen Pix Pro 5.1.

Posteriormente estos datos se incluyeron en la web <https://genome.unc.edu/> que permite el almacenamiento, normalización, filtrado del dato bruto y análisis de los datos. Sólo los genes que presentan expresión en al menos el 70% de las muestras se incluyen en el análisis.

Para el análisis de agrupamientos se utilizaron los programas Gene Cluster.3 y Java Treeview.2.

Con el objeto de conocer el significado de los genes implicados en el estudio PAM50 se empleó el programa informático DAVID (Database for Annotation and Integrated Discovery) al que se puede acceder a través de internet en la dirección: <http://david.abcc.ncifcrf.gov>. Este programa informático permite hacer un análisis funcional de los genes a estudio ya que proporciona información sobre genes relacionados entre sí, las vías moleculares en las que se encuentra implicado cada gen, conocer las patologías médicas con las que se relaciona un gen, acceder a publicaciones previas que estudian el papel de determinados genes, etc.

Por último, la clasificación en los subtipos intrínsecos Luminal A, Luminal B, HER2-enriched y Basal-like se realizó mediante el empleo del método PAM50 según lo establecido por Parker et al⁽³⁵⁾ (Figura 11). Los datos obtenidos del análisis de microarrays presentados en nuestro trabajo están disponibles en la base de datos Gene Expression (Nº GSE21997).

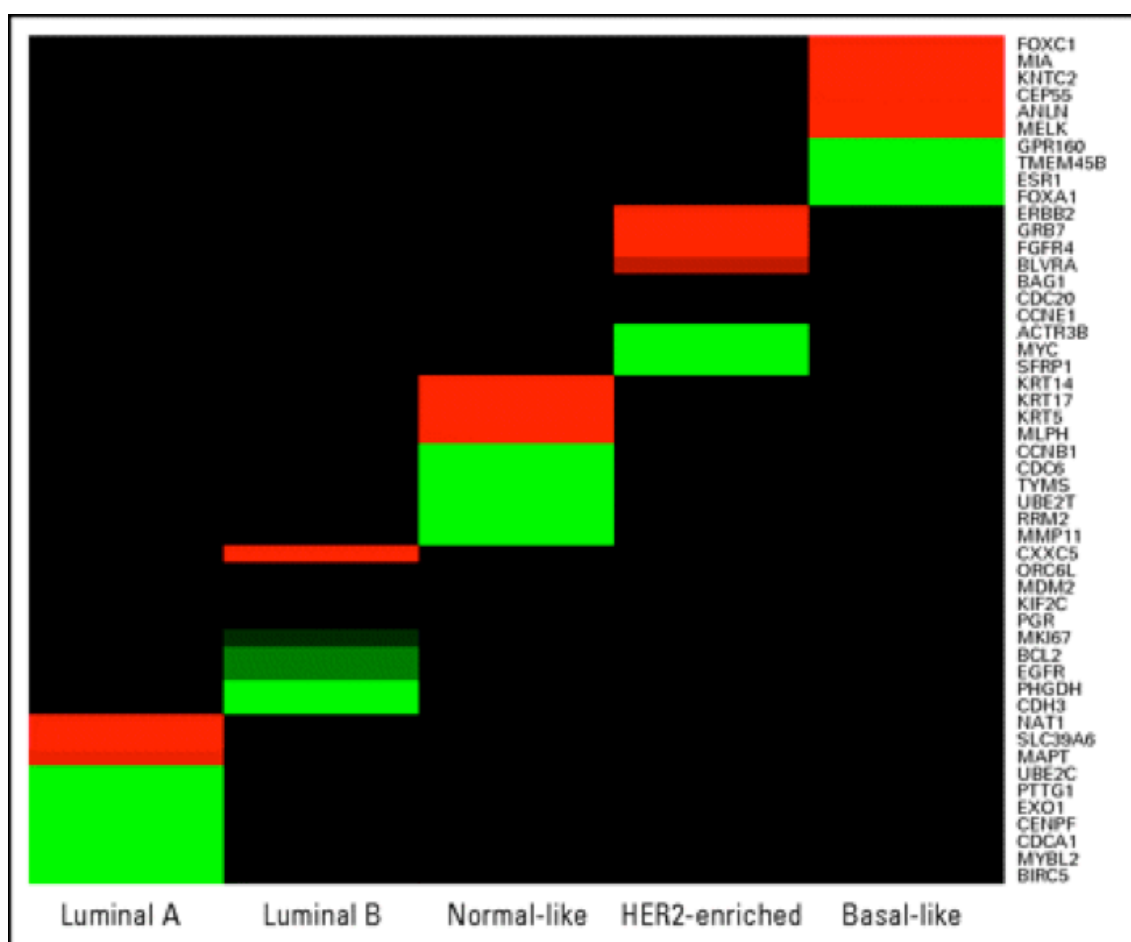


Figura 11 .Clasificación en subtipos tumorales intrínsecos por centroides más cercanos. A la derecha de la tabla se encuentran los genes seleccionados para cada subtipo (10 genes por cada subtipo tumoral). Los 10 genes para cada subtipo se muestran como rojo o verde de acuerdo con su expresión en una clase. Rojo: Alta expresión. Verde: Baja expresión. Negro: el gen no fue seleccionado para la el subtipo. Fuente: Parker JS et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. J Clin Oncol. 2009;27(8):1160-7.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para describir los datos estadísticos obtenidos se utilizan las medidas de centralización y de dispersión, en el caso de las variables cuantitativas, de tal manera que se describen empleando la media, la desviación estándar y los cuartiles (mínimo, máximo, mediana y rango intercuartil). Las variables cualitativas se describen mediante frecuencias absolutas (N) y relativas (%).

Evaluamos el cambio del subtipo definido mediante IHQ entre la biopsia y la pieza quirúrgica (Luminal A-like , Luminal B-like, HER2 y Triple negativo) y de los marcadores inmunohistoquímicos (RE, RP, HER2 y ki67) en su medida cualitativa (positivo/negativo, alto/bajo) mediante el test de asimetría de Mc Nemar y en su medida cuantitativa (porcentaje de expresión) mediante el test de Wilcoxon, test no paramétrico para dos muestras relacionadas. Como resultado se da también el porcentaje de cambio estimado y su intervalo de confianza al 95%.

Para comparar las diferencias en el cambio del ki67 entre la biopsia y la cirugía en los distintos subtipos-IHQ, calculamos la diferencia absoluta y aplicamos el test no paramétrico de Kruskal Wallis. Posteriormente, calculamos el valor del test para comparaciones post-hoc. Para comparar las diferencias en el cambio del ki67 según el tratamiento, aplicamos el test T-Student para las diferencias absolutas y el test U de Mann Whitney para las diferencias relativas. También se ha analizado considerando las diferencias como variable cualitativa, tomando como punto de corte $ki67 \geq 20\%$. En estos casos se ha aplicado el test exacto de Fisher.

Para estudiar la concordancia entre el diagnóstico del subtipo-IHQ y el subtipo intrínseco se estima el índice Kappa de concordancia y su intervalo de confianza al 95%. La asimetría en las discrepancias se analiza mediante el test de asimetría de McNemar. A su vez, para valorar el grado de concordancia entre el subtipo-IHQ y el genómico lo haremos de acuerdo con los criterios definidos por Landis et al ⁽¹⁰²⁾ empleando el índice kappa.

Considerando el diagnóstico genómico como la técnica gold standard para definir el subtipo tumoral intrínseco, estudiamos la capacidad diagnóstica de subtipo tumoral definido mediante IHQ (en la biopsia por trucut, la pieza quirúrgica y el subtipo-IHQ compuesto). Estimamos los índices de sensibilidad y especificidad, los valores predictivos positivo y negativo, la tasa de falsos positivos y falsos negativos y el índice de Youden $Y=S+E-1$. Estos índices se acompañan del intervalo de confianza al 95% calculado con el método de Wilson ⁽¹⁰³⁾.

Para estudiar las diferencias en la respuesta medida como pCR, Symmans 0-I/II-III y Miller & Payne (sensible/resistente/intermedio), en función del subtipo trucut y el tratamiento, se ha aplicado el test chi-cuadrado o el test exacto de Fisher. Al estudiar la respuesta medida como Miller & Payne (1-5) o Symmans (0-III) se han aplicado los test no paramétricos de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney por la naturaleza ordinal de estas variables. Cuando se ha comparado la respuesta pCR en función del subtipo tumoral se ha utilizado el test no paramétrico de Kruskal Wallis y cuando se ha comparado la respuesta en función del tratamiento de QT se han aplicado los test T-Student o U de Mann Whitney según la distribución de los datos.

Los contrastes de hipótesis se realizan en todos los casos bilaterales y con un nivel de significación de 0.05. Todos estos análisis han sido realizados con el paquete estadístico SPSS 17 y epidat 4.1⁽¹⁰⁴⁾.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO

Se incluyeron en el análisis 179 pacientes con estudio IHQ completo de RE, RP y ki67 y determinación de HER2 mediante IHQ y/o FISH en la biopsia por trucut y en la pieza quirúrgica. Las características clínico-patológicas iniciales de las pacientes y las características IHQ de la biopsia por trucut se recogen en las siguientes tablas (Tablas 9 y 10).

Características de las pacientes		
Edad	Media \pm Desviación	52 \pm 13
	Mediana (Rango intercuartílico)	50 (40.5 - 62)
	Rango	26 - 79
Estadio	IIA	5 (2.8%)
	IIB	61 (34.5%)
	IIIA	62 (35%)
	IIIB	49 (27.7%)
T	1	1 (0.6%)
	2	61 (34.5%)
	3	64 (36.2%)
	4	51 (28.8%)
N	0	34 (19.2%)
	1	110 (62.1%)
	2	33 (18.6%)
Tamaño	Media \pm Desviación	5.9 \pm 2.3
	Mediana (Rango intercuartílico)	6 (4 - 7)
	Rango	2 - 15
Histología	Anillo de sello	1 (0.6%)
	Ductal	145 (81%)
	Lobulillar	25 (14%)
	Medular	4 (2.2%)
	Mucinoso	2 (1.1%)
	Tubular	2 (1.1%)
Tratamiento	Adriamicina	99 (55.3%)
	Docetaxel	80 (44.7%)

Tabla 9. Características clínicas y anatomopatológicas de las pacientes incluidas en el estudio.

Características del tumor		
R.Estrógenos	Negativo (<1%)	69 (38.5%)
	Positivo (≥1%)	110 (61.5%)
R.Progesterona	Negativo (<1%)	82 (45.8%)
	Positivo (≥1%)	97 (54.2%)
R.Progesterona	Bajo (<20%)	94 (52.5%)
	Alto (≥20%)	85 (47.5%)
R.Hormonales	Negativo (R.E<1% y/o R.P<1%)	64 (35.8%)
	Positivo (R.E≥1% y/o R.P≥1%)	115 (64.2%)
HER2	Negativo (1+ o 2+, FISH neg)	128 (71.5%)
	Positivo (3+ o FISH pos)	51 (28.5%)
Ki67	Bajo (<20%)	55 (30.7%)
	Alto (≥20%)	124 (69.3%)
Grado	1	6 (3.4%)
	2	96 (53.9%)
	3	76 (42.7%)

Tabla 10. Características inmunohistoquímicas de las muestras obtenidas mediante biopsia por trucut.

En la biopsia, la mediana del porcentaje de expresión de RE es del 30%, siendo éste valor superior al 80% en el 25% de las pacientes mientras que la mediana del porcentaje de expresión de RP es del 5%, menor que la del RE. El índice ki67 es superior al 50% en el 25% de las pacientes siendo su mediana de expresión del 30% y la mitad de las pacientes tienen valores altos de expresión comprendidos entre el 15% y el 50%.

Tras definir los distintos subtipos tumorales definidos mediante IHQ (Figura 12) se observa que:

-Las pacientes con tumores subtipo-IHQ Luminal A-like en la biopsia presentan una mediana de expresión de RE y RP del 60% y 77,5%, respectivamente, mientras que son del 50% y 15% en los tumores con subtipo-IHQ Luminal B-like. Un 31,8% de tumores

subtipo Luminal B-like son HER2 positivos definido mediante técnicas de IHQ y/o FISH.

La mediana de expresión de ki67 es de 10% y 30% en los tumores subtipo-IHQ Luminal A-like y Luminal B- like, respectivamente.

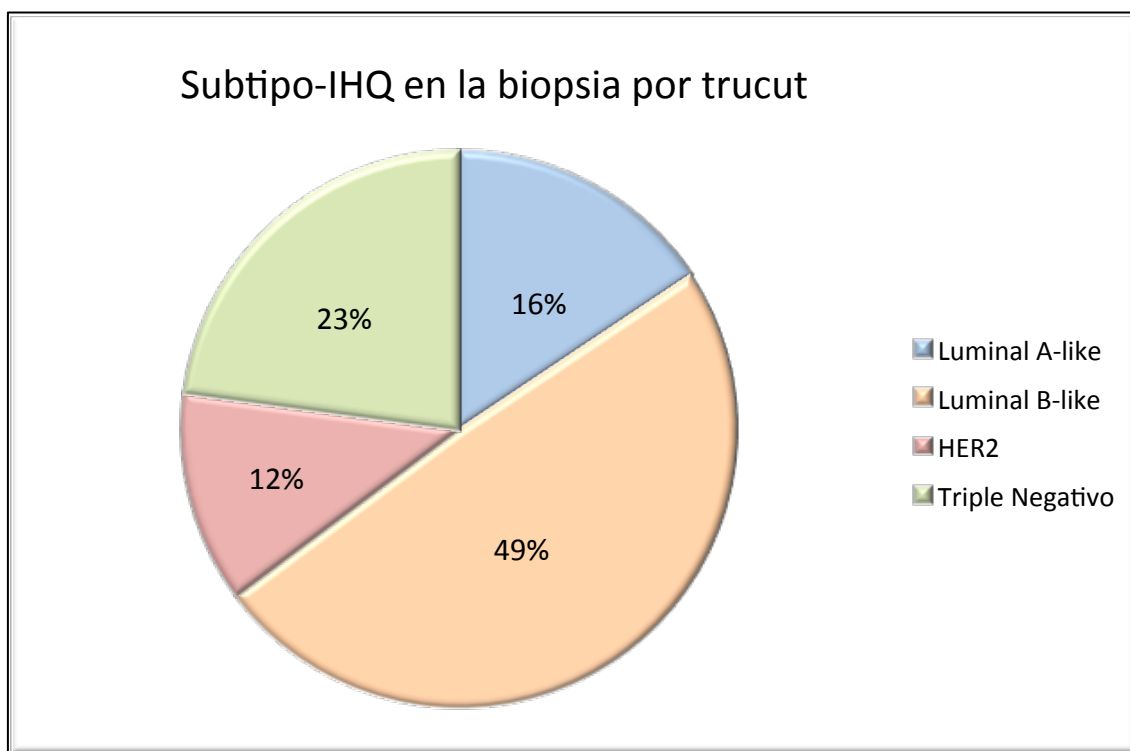


Figura 12. Distribución de los subtipos tumorales definidos mediante IHQ en la biopsia por trucut.

-Las pacientes con tumores subtipo-IHQ HER2 en la biopsia no presentan expresión de RE ni RP y la mediana de expresión de ki67 es de 39,5%, la más alta tras los tumores Triple Negativo. Sólo un 25% de estas pacientes tienen una expresión de un ki67 menor al 25%.

-Por definición, los tumores con subtipo-IHQ Triple Negativo no presentan expresión de RE, RP o HER2 y la mediana del porcentaje de expresión de ki67 es del 50%,

superior a los demás subtipos tumorales. Hasta un 25% de pacientes con subtipo-IHQ Triple Negativo presentan índice de proliferación ki67 superior al 70%.

4.2. CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS DE LOS TUMORES EN FUNCIÓN DEL SUBTIPO INTRÍNSECO (PAM50)

De las 179 pacientes incluidas en el análisis , 91 disponen de estudio genómico sobre la biopsia inicial mediante el empleo de la plataforma genómica PAM50 (Figura 13).

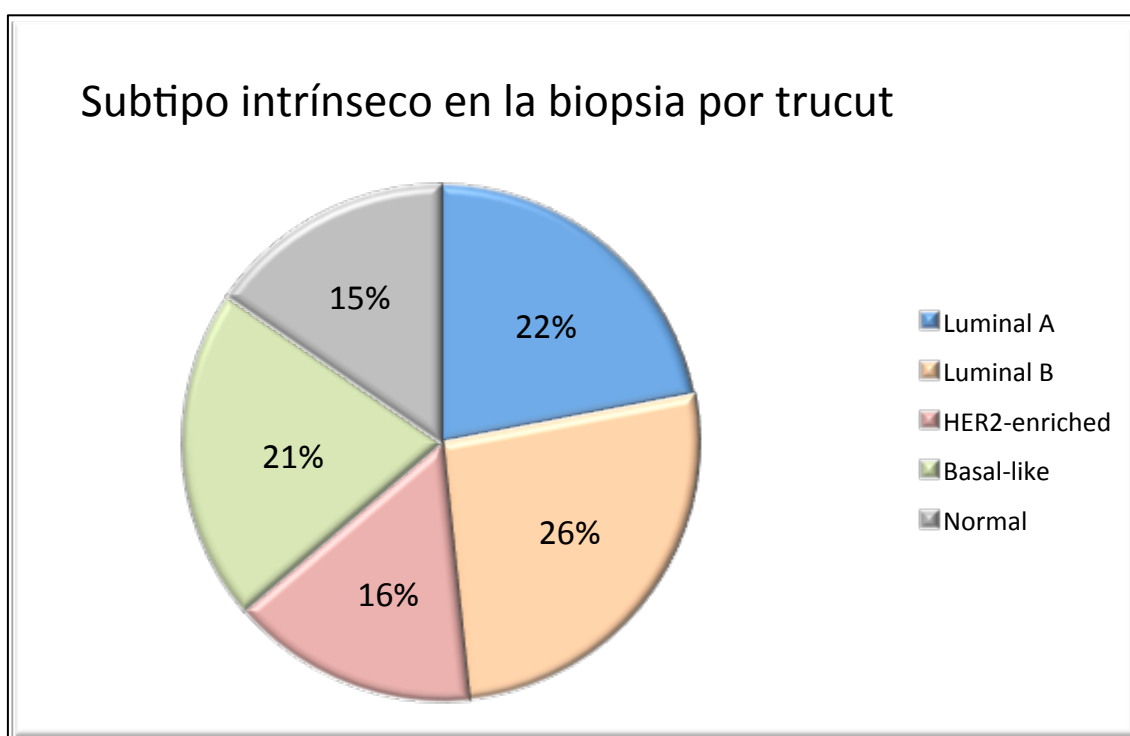


Figura 13. Distribución de los subtipos tumorales intrínsecos, definidos mediante estudio genómico PAM50, en la biopsia por trucut.

De estas 91 pacientes, el 58,2% expresan RE, el 54,9% RP y el 29,7% son HER2 positivas. La mediana del porcentaje de expresión de ki67 es del 30%, siendo este índice alto en el 67% de estas pacientes.

Las características IHQ de los tumores según el subtipo intrínseco son (Tabla 11):

- Subtipo intrínseco Luminal A: Los tumores definidos como Luminal A mediante estudio genómico se caracterizan por presentar una alta expresión de receptores hormonales y una baja expresión de ki67, siendo la mediana del porcentaje de expresión de RE el 70% y de RP el 45%. La expresión de RP es superior o igual al 20% en un elevado porcentaje de pacientes. La mediana de expresión de ki67 es de 12,5% . La mayoría de estos tumores no presentan sobreexpresión de HER2.
- Subtipo intrínseco Luminal B: Al igual que los tumores Luminal A, se caracterizan por la alta expresión de RE (Mediana: 80%) y RP (Mediana: 70%) y baja sobreexpresión de HER2. En este caso los niveles de ki67 son superiores, siendo la mediana de expresión de 45%. Mientras que en los tumores con subtipo intrínseco Luminal A el porcentaje de expresión de ki67 es superior al 30% solo en el 25% de las pacientes, en los tumores con subtipo intrínseco Luminal B lo es en más de la mitad de las pacientes.
- Subtipo intrínseco HER2-enriched: La mayoría de estos tumores se caracterizan por presentar sobreexpresión de HER2 y baja expresión de receptores hormonales con bajos niveles de expresión de RE y RP, siendo la mediana de expresión de RE y RP de 0 y la media de expresión de 28,6% en ambos casos. Todas las que expresan RP presentan valores

superiores o iguales al 20% .El índice de proliferación de ki67 presenta una elevada mediana de expresión (55%), solo inferior a la de los tumores basales, siendo alto en todas las pacientes.

- Subtipo intrínseco Basal-like: Este subtipo tumoral se caracteriza por la escasa expresión de HER2 y de los receptores hormonales. Los tumores con subtipo Basal-like son los que presentan un mayor índice de proliferación, siendo la mediana de expresión de ki67 de 60%, y solo un 25% de las pacientes presentan un índice $ki67 < 25\%$ en este grupo.

- Subtipo intrínseco Normal-like: Este subtipo se caracteriza por la ausencia de sobreexpresión de HER2 en la mayoría de las pacientes. Son tumores que presentan menor número de tumores con receptores hormonales positivos y porcentajes de expresión de receptores hormonales menores que los tumores con subtipo intrínseco Luminal A y B, aunque mayor que los tumores Basal-like y HER2-enriched. El nivel de expresión de ki67 es bajo, el 75% de las pacientes de este grupo presentan un índice $ki67 < 30\%$.

			Suptipo intrínseco en la biopsia trucut (PAM50)				
			Luminal A	Luminal B	Her2-enriched	Basal-like	Normal-like
			N	20	24	14	19
Características IHQ	RE	Negativo	4 (20%)	4 (16.7%)	9 (64.3%)	15 (78.9%)	6 (42.9%)
		Positivo	16 (80%)	20 (83.3%)	5 (35.7%)	4 (21.1%)	8 (57.1%)
	RP	Negativo	6 (30%)	5 (20.8%)	8 (57.1%)	16 (84.2%)	6 (42.9%)
		Positivo	14 (70%)	19 (79.2%)	6 (42.9%)	3 (15.8%)	8 (57.1%)
		Bajo	6 (30%)	7 (29.2%)	8 (57.1%)	17 (89.5%)	8 (57.1%)
		Alto	14 (70%)	17 (70.8%)	6 (42.9%)	2 (10.5%)	6 (42.9%)
	HER2	Negativo	17 (85%)	17 (70.8%)	3 (21.4%)	17 (89.5%)	10 (71.4%)
		Positivo	3 (15%)	7 (29.2%)	11 (78.6%)	2 (10.5%)	4 (28.6%)
	ki67	Bajo	13 (65%)	8 (33.3%)	0 (0%)	2 (10.5%)	7 (50%)
		Alto	7 (35%)	16 (66.7%)	14 (100%)	17 (89.5%)	7 (50%)

Tabla 11. Porcentajes de expresión de RE, RP, HER2 y ki67 en función del subtipo intrínseco definido mediante PAM50.

4.3. VALORACIÓN DEL CAMBIO DE LOS RECEPTORES DETERMINADOS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA TRAS LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE

De las 179 pacientes, 21 pacientes presentaron respuesta completa patológica tras QT neoadyuvante por lo que el análisis del cambio se realiza sobre las 158 pacientes restantes.

Las características de las pacientes que presentan respuesta completa patológica se presentan en el apartado 4.9.

Se ha analizado el cambio en la expresión de los receptores hormonales (RE y RP) , HER2 y ki67 entre la determinación de la biopsia por trucut y el espécimen quirúrgico, tras el tratamiento con quimioterapia neoadyuvante (Tabla 12).

El 12% (IC 95%: 7,4-18,1%) de las pacientes presentaron cambio en expresión de RE, un 22,2% (IC 95%: 15,9-29,4%) presentó cambio en expresión de RP y un 14% (IC 95%: 8,9-20,3%) presentó cambio en la expresión de HER2, todos ellos medidos como

estatus positivo o negativo con los criterios mencionados en el apartado: Material y Métodos.

No se observó asociación entre el cambio de estatus de HER2 y el cambio de estatus de RH. De los 22 pacientes que presentan cambios en el estatus de HER2, solo 3 de ellos presentan cambio en RH. Este cambio de los RH sigue el mismo sentido en uno de los pacientes (pérdida de HER2 y cambio de estatus de RH de positivo a negativo) y es en sentido contrario en los otros dos (ganancia de HER2 y cambio de estatus de RH de positivo a negativo).

Al analizar los cambios en RE, RP, RH y HER2 se observa un mayor porcentaje de cambio de estatus de positivo a negativo tras el tratamiento con QT neoadyuvante, que en sentido contrario, en los tres casos. De todas las pacientes que presentan cambio de estatus de RE, RP, RH y HER2 el 68,4%, 60%, 52,2% y el 63,6% presentan cambio de estatus de positivo a negativo, respectivamente. Aunque ninguno de estos cambios de estatus son estadísticamente significativos, sí son clínicamente significativos ya que el cambio de estatus de HER2 podría ocasionar un cambio en la decisión terapéutica en un 14% (IC 95%: 8,9%-20,3%) de las pacientes para el tratamiento con trastuzumab y el cambio de estatus de RH podría asociarse a un cambio en la decisión terapéutica en el 14,6% (IC 95%: 9,5%-21%) de las pacientes para la terapia hormonal.

En relación con la expresión de ki67, un 44,3% (IC 95%: 36,2 a 52,4%) de las pacientes presentan un cambio en la expresión, siendo este cambio mayor de manera

estadísticamente significativa cuando se produce de alto nivel de expresión (definido como expresión mayor o igual al 20%) a baja expresión de ki67, cambio que se observa en el 90% de las pacientes que presentan cambio de ki67 tras el tratamiento de QT neoadyuvante.

		n=158	IHQ en la pieza quirúrgica (RE, RP, RH, HER2, ki67)		test Mc Nemar
			Negativo/Bajo	Positivo/Alto	
IHQ en la biopsia trucut	RE	Negativo	52 (32.9%)	6 (3.8%)	0,167
		Positivo	13 (8.2%)	87 (55.1%)	
	RP	Bajo	63 (39.9%)	17 (10.8%)	0,627
		Alto	21 (13.3%)	57 (36.1%)	
		Negativo	54 (34.2%)	14 (8.9%)	0,311
		Positivo	21 (13.3%)	69 (43.7%)	
	RH	Negativo	42 (26.6%)	11 (7%)	1
		Positivo	12 (7.6%)	93 (58.9%)	
	HER2	Negativo	103 (65.2%)	8 (5.1%)	0,286
		Positivo	14 (8.9%)	33 (20.9%)	
	Ki67	Bajo	42 (26.6%)	7 (4.4%)	<0.001
		Alto	63 (39.9%)	46 (29.1%)	

Tabla 12. Cambios cualitativos en la expresión RE, RP, HER2, ki67 entre la pieza quirúrgica y la biopsia por trucut tras el tratamiento neoadyuvante.

De todas las pacientes que presentan cambio de estatus de Ki67 de alto a bajo, el 87,3% son Luminal B-like, el 6,3% HER2 y el 6,3% Triple Negativo. Por lo tanto, el descenso en los niveles de ki67 es mayor en las pacientes con subtipo tumoral Luminal B-like en la biopsia por trucut que en el resto de subtipos tumorales definidos mediante IHQ, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0,001$).

No observamos diferencias significativas en el descenso de ki67 en función del tratamiento recibido (adriamicina o docetaxel) aunque el 47% de las pacientes tratadas con adriamicina y el 30% de las tratadas con docetaxel presentan cambio de estatus de ki67 de alto a bajo nivel de expresión ($p=0,068$).

Cuando consideramos las variables que se expresan de manera cuantitativa (medidos en % de expresión de RE, RP y ki67) antes y después de la quimioterapia (Tabla 13), se observa una menor correlación estadísticamente significativa entre los porcentajes de expresión de ki67 y RP pre y post-quimioterapia, que no se observa en el caso de los RE, presentando un descenso significativo en los valores de ki67 y RP en la determinación sobre la pieza quirúrgica.

	Mediana y rango intercuantílico de los % de expresión IHQ		Cambio en los % de expresión IHQ	
	Biopsia trucut	Pieza quirúrgica	Coefficiente de correlación rho Spearman	test de Wilcoxon
RE	30 (0 - 80)	30 (0 - 76.3)	0,68	0,127
RP	15 (0 - 70)	6 (0 - 50)	0,60	0,049
KI67	30 (15-50)	7(2-30)	0,44	<0.001

Tabla 13. Variabilidad cuantitativa de los porcentajes de expresión de RE, RP y Ki67 entre la pieza quirúrgica y la biopsia por trucut tras el tratamiento con QT neoadyuvante.

4.4. VALORACIÓN DEL CAMBIO DE SUBTIPO TUMORAL DEFINIDO MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

Los subtipos-IHQ (tanto el subtipo de la biopsia trucut como el de la pieza quirúrgica) se definieron agrupando los datos de la expresión de los RH (RE y RP), HER2 (medido

mediante IHQ y/o FISH) y el índice ki67 según los criterios definidos en el documento elaborado por el grupo de expertos internacionales de St.Gallen de 2013⁽⁶⁸⁾.

En base a estos criterios, como se describe en el apartado de Material y Métodos, se definen 4 subtipos-IHQ: Luminal A-like, Luminal B-like, HER2 y Triple negativo.

Se produjo cambio de subtipo-IHQ tumoral en el 36.7% (n=58) de las pacientes (IC 95%: 29,2 % a 44,7%) (Tabla 14).

En el caso de las pacientes con subtipo-IHQ Luminal A-like en la biopsia, un 32% presenta cambio de subtipo en la pieza quirúrgica, siendo el cambio mas frecuente a subtipo Luminal B-like.

En las pacientes subtipo-IHQ Luminal B-like en la biopsia, el 45,1% pacientes presentan cambio de subtipo que en la mayoría de los casos son Luminal A-like en la pieza quirúrgica.

Las pacientes con subtipo-IHQ HER2 en la biopsia por trucut presentan el mayor porcentaje de cambio de subtipo (47,4 %), siendo el cambio más frecuente a subtipo Luminal B-like.

A diferencia de las anteriores, las pacientes con subtipo-IHQ Triple Negativo son las que presentan menor porcentaje de cambio de subtipo tumoral en la pieza quirúrgica tras QT neoadyuvante (14,7%).

Tras evaluar estos cambios, existe un cambio estadísticamente significativo de subtipo tumoral (definido mediante IHQ) tras el tratamiento neoadyuvante debido fundamentalmente al cambio de 25 pacientes (el 43,1% de las pacientes que presentan cambio de subtipo-IHQ) que presentan cambio de subtipo-IHQ con subtipo Luminal B-like en la biopsia por trucut que en la pieza quirúrgica presentan subtipo Luminal A-like (test de Mc Nemar <0,05).

		Subtipo-IHQ en la pieza quirúrgica				test Mc Nemar
		N	Luminal A-like	Luminal B-like	HER2	
Subtipo-IHQ en la biopsia trucut	Luminal A-like	25	17 (68%)	7 (28%)	1 (4%)	p=0.001
	Luminal B-like	80	25 (31.3%)	44 (55%)	3 (3.8%)	
	HER2	19		6 (31.6%)	10 (52.6%)	
	Triple Negativo	34	3 (8.8%)	2 (5.9%)		
						29 (85.3%)

Tabla 14. Porcentajes de cambio de subtipo-IHQ entre la biopsia por trucut y la pieza quirúrgica tras tratamiento con QT neoadyuvante.

Las causas del cambio de subtipo-IHQ tras el tratamiento neoadyuvante son:

- Cambio de subtipo-IHQ Luminal B-like a Luminal A-like (Tabla 15): En la mayoría de las pacientes (64%) el cambio de subtipo tumoral es consecuencia del cambio de sólo uno de los marcadores (HER2, RP o ki67), siendo el descenso de ki67 en la pieza quirúrgica el cambio más frecuente (52%). En un menor porcentaje de pacientes este cambio de subtipo se produce por la pérdida de HER2 asociado a un descenso de ki67 (20%) o un incremento de la expresión de RP asociado o no a un descenso de ki67 (16% y 4%, respectivamente) o simplemente a la pérdida de HER2 (8%) .

Aunque el cambio de subtipo Luminal B-like a Luminal A-like es el que afecta a un mayor número de pacientes, dentro de cada subtipo tumoral los cambios más frecuentes son:

Cambios en los marcadores IHQ en las pacientes con cambio de subtipo-IHQ Luminal B-like a Luminal A-like			
Cambio RP bajo/alto	Cambio HER2 +/-	Cambio ki67 alto/bajo	N
No	No	Sí	13
No	Sí	No	2
Sí	No	No	1
No	Sí	Sí	5
Sí	No	Sí	4

Tabla 15. Cambios en la expresión de los RE, RP, HER2 y ki67 en las pacientes que presentan cambio de subtipo-IHQ Luminal B-like a Luminal A-like.

- Cambio de subtipo-IHQ Luminal A-like a Luminal B-like : Este cambio es el que se produce con mayor frecuencia en las pacientes Luminal A-like y se relaciona con la disminución de expresión de RP (menor del 20% en la pieza quirúrgica) en el 57,1 % de las pacientes. En el resto de las pacientes este cambio de subtipo es debido a un aumento de expresión de ki67, siendo mayor o igual al 20% en la pieza quirúrgica.
- El cambio de subtipo-IHQ HER2 a Luminal B-like : Siendo el cambio del subtipo HER2 más frecuente, en todos los casos este cambio se produce por la positividad de los RH en la pieza quirúrgica (5 de las 6 pacientes por aumento de expresión de RP) , manteniéndose la positividad de HER2.

- Las pacientes con subtipo-IHQ Triple Negativo que presentan cambio de subtipo es debido al aumento en la expresión de los RH (cambio a subtipo Luminal A o B-like) aunque, como se ha descrito previamente, este cambio es poco frecuente.

4.5. ESTUDIO DE CONCORDANCIA DEL SUBTIPO DEFINIDO MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA Y EL SUBTIPO INTRÍNSECO (PAM50)

De las 179 pacientes incluidas en el análisis, 91 pacientes disponen de estudio de perfil genómico mediante PAM50 en la biopsia por trucut. De estas 91 pacientes se han excluido del análisis aquellas con subtipo Normal-like (14 pacientes) dado que no se correlaciona con ningún subtipo definido mediante IHQ. En estas 77 pacientes disponemos del subtipo-IHQ y del subtipo intrínseco definido mediante el empleo de PAM50 de la biopsia trucut en todas las pacientes pero solo 66 pacientes disponen de subtipo-IHQ en la pieza quirúrgica dado que hay 11 pacientes que presentan pCR.

Para reflejar con claridad la conducta clínica que se realiza en función de los valores de los distintos parámetros de IHQ antes y después de la quimioterapia, hemos definido un nuevo subtipo llamado “subtipo-IHQ compuesto” basado en los resultados positivos y de mayor valor de las determinaciones de IHQ: RE, RP , HER2 y ki67 de la biopsia o de la pieza quirúrgica. Este subtipo-IHQ compuesto pretende reflejar la práctica habitual de los oncólogos. En la práctica habitual, en caso de presentar positividad de RE, RP o HER2 en alguna de las dos determinaciones (biopsia trucut o

pieza quirúrgica), se plantea beneficio de tratamiento diana (hormonal o terapia anti-HER2).

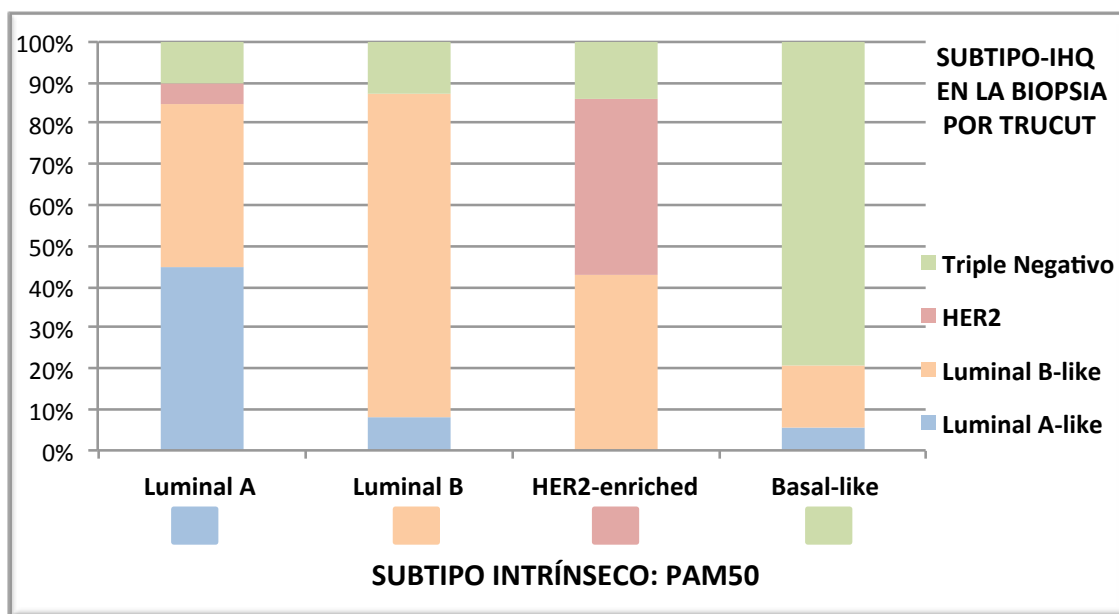


Figura 14. Distribución de los subtipos-IHQ en la biopsia trucut y concordancia con los subtipos intrínsecos.

Por otro lado, en nuestro estudio se trabaja con las observaciones de Almendro et al⁽¹⁰⁵⁾ de que el subtipo intrínseco no varía tras el tratamiento con QT neoadyuvante por lo que emplearemos el subtipo intrínseco obtenido de la aplicación de PAM50 sobre biopsia como técnica gold standard.

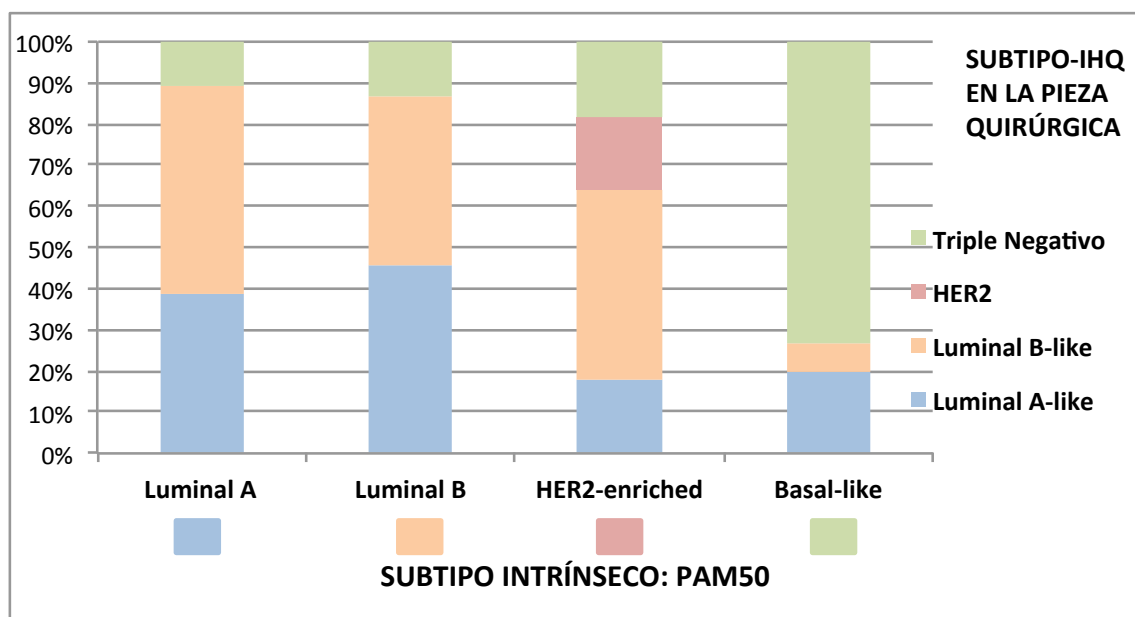


Figura 15. Distribución de los subtipos-IHQ en la pieza quirúrgica y concordancia con los subtipos intrínsecos.

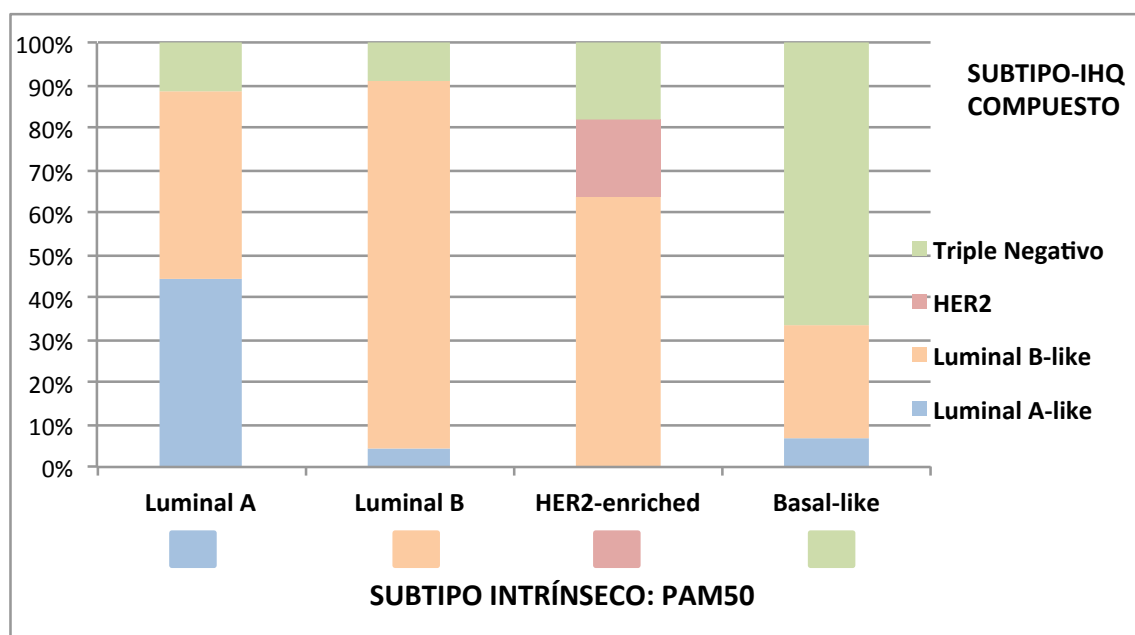


Figura 16. Distribución de los subtipos-IHQ compuestos y concordancia con los subtipos intrínsecos.

Tras comparar el subtipo intrínseco con el subtipo-IHQ de la biopsia por trucut, el subtipo-IHQ de la pieza quirúrgica y el subtipo-IHQ compuesto, se observa una mayor concordancia del subtipo intrínseco con el subtipo-IHQ de la biopsia por trucut y el

subtipo-IHQ compuesto que con el subtipo-IHQ de la pieza quirúrgica (Figuras 14, 15 y 16). Mientras que el grado de concordancia del subtipo intrínseco con el subtipo-IHQ de la biopsia por trucut y el subtipo-IHQ compuesto es moderado (coeficiente kappa= 0,499 y 0,4, respectivamente), el grado de concordancia con el subtipo-IHQ de la pieza quirúrgica es pobre (coeficiente kappa=0,222) (Tabla 16).

Este moderado grado de concordancia del subtipo-IHQ de la biopsia y subtipo-IHQ compuesto con el subtipo intrínseco está en relación con:

- 1.- Un alto porcentaje de pacientes Luminal A (PAM50) que son definidas mediante IHQ como subtipo Luminal B-like (40% de los tumores Luminal A en la biopsia y el 44,4% en el subtipo-IHQ compuesto).
- 2.- Un elevado porcentaje de tumores HER2-enriched que son clasificados mediante IHQ como tumores Luminal B-like (42,9% en la biopsia y 63,6% con el subtipo-IHQ compuesto).

El pobre grado de concordancia en la pieza quirúrgica del subtipo intrínseco y el definido mediante IHQ está en relación con los hallazgos descritos anteriormente pero en este caso también se asocia un porcentaje similar de tumores Luminal B (PAM50) clasificados como Luminal A-like en la pieza quirúrgica (45,5%), responsable de este menor grado de concordancia sobre la pieza quirúrgica entre el subtipo intrínseco y el subtipo definido mediante IHQ.

		Subtipo intrínseco				Medidas de concordancia	
		Luminal A	Luminal B	HER2-enriched	Basal-like	Indice Kappa, IC95%	Test Mc Nemar
Subtipo IHQ Biopsia n=77	Luminal A-like	9 (45%)	2 (8,3%)		1(5,3%)	0,499 0.354 - 0.644	0,022
	Luminal B-like	8 (40%)	19 (79,2%)	6 (42,9%)	3(15,8%)		
	HER2	1 (5%)		6 (42,9%)			
	Triple Negativo	2 (10%)	3 (12,5%)	2 (14,3%)	15 (78,9%)		
Subtipo IHQ Pieza quirúrgica n=66	Luminal A-like	7 (38,9%)	10 (45,5%)	2 (18,2%)	3 (20%)	0,222 0.053 - 0.391	0,114
	Luminal B-like	9 (50%)	9 (40,9%)	5 (45,5%)	1 (6,7%)		
	HER2			2 (18,2%)			
	Triple Negativo	2 (11,1%)	3 (13,6%)	2 (18,2%)	11 (73,3%)		
Subtipo IHQ Compuesto n=66	Luminal A-like	8 (44,4%)	2 (9%)		1 (6,7%)	0,4 0.241 - 0.559	0,018
	Luminal B-like	8 (44,4%)	18 (81,8%)	7 (63,6%)	4 (26,7%)		
	HER2			2 (18,2%)			
	Triple Negativo	2 (11,1%)	2 (9%)	2 (18,2%)	10 (66,7%)		

Tabla 16. Concordancia entre subtipos basados en determinaciones de IHQ (en la biopsia trucut, pieza quirúrgica y subtipo-IHQ compuesto) y subtipo intrínseco definido mediante la plataforma PAM50.

4.6. VALIDEZ DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA DEL SUBTIPO INTRÍNSECO EN COMPARACIÓN CON EL GOLD STANDARD (PAM50)

La capacidad diagnóstica del subtipo definido mediante IHQ para detectar el verdadero subtipo intrínseco es diferente en cada subtipo tumoral (Tabla 17):

- Subtipo Luminal A-like: En este tipo de tumores la IHQ sobre la biopsia y la pieza quirúrgica es una prueba con una alta tasa de falsos negativos y baja tasa de falsos positivos, siendo este error mayor en la pieza quirúrgica.

En este caso la creación del subtipo-IHQ compuesto mejora la especificidad de la IHQ como prueba diagnóstica, disminuyendo la tasa de falsos positivos en este grupo de pacientes y manteniendo similar sensibilidad que la determinación IHQ sobre la biopsia.

- Subtipo Luminal B-like: En esta caso la IHQ sobre la biopsia tiene una alta tasa de falsos positivos y una baja tasa de falsos negativos, mayor en los dos casos en la pieza quirúrgica. El subtipo-IHQ compuesto permite en este subgrupo de pacientes mejorar su validez diagnóstica al disminuir la tasa de falsos negativos, permitiendo identificar correctamente los verdaderos casos de tumores Luminal B en más de un 85% de los casos.

- Subtipo HER2: La probabilidad de clasificar correctamente a pacientes subtipo HER2-enriched mediante IHQ/FISH de la biopsia y la pieza quirúrgica es baja (<50%) presentando una alta tasa de falsos negativos. Este error es mucho mayor en el estudio de la pieza quirúrgica y no mejora con el subtipo-IHQ compuesto, siendo la determinación de IHQ/FISH sobre la biopsia la de mayor validez diagnóstica en este grupo de tumores.

Sin embargo, la IHQ/FISH sobre la biopsia y la pieza quirúrgica ofrece una baja tasa de falsos positivos, aún menor en la pieza quirúrgica.

- Subtipo Triple Negativo: En este caso la técnica de IHQ sobre la biopsia o la pieza quirúrgica tiene una muy baja tasa de falsos positivos y es en el subtipo tumoral en el que se observan menos diferencias a la hora de detectar verdaderos tumores Basal-like (sensibilidad) entre las determinaciones en la biopsia o la pieza quirúrgica, siendo ambas determinaciones igual de válidas. En este caso tampoco el subtipo-IHQ compuesto ofrece beneficios dado que aunque disminuye la tasa de falsos positivos, aumenta de la tasa de falsos negativos.

Subtipo-IHQ Biopsia trucut	Luminal A-like	Luminal B-like	HER2	Triple Negativo
N	20	24	14	19
Sensibilidad	45,0%	79,2%	42,9%	78,9%
	25.8% - 65.8%	59.5% - 90.8%	21.4% - 67.4%	56.7% - 91.5%
Especificidad	94,7%	67,9%	98,4%	87,9%
	85.6% - 98.2%	54.5% - 78.9%	91.5% - 99.7%	77.1% - 94%
Subtipo-IHQ Pieza Quirúrgica	Luminal A-like	Luminal B-like	HER2	Triple Negativo
N	18	22	11	15
Sensibilidad	38,9%	40,9%	18,2%	73,3%
	20.3% - 61.4%	23.3% - 61.3%	5.1% - 47.7%	48% - 89.1%
Especificidad	68,8%	65,9%	100,0%	86,3%
	54.7% - 80.1%	51.1% - 78.1%	93.5% - 100%	74.3% - 93.2%
Subtipo-IHQ Compuesto	Luminal A-like	Luminal B-like	HER2	Triple Negativo
N	18	22	11	15
Sensibilidad	44,4%	86,4%	18,2%	66,7%
	24.6% - 66.3%	66.7% - 95.3%	5.1% - 47.7%	41.7% - 84.8%
Especificidad	95,8%	56,8%	100,0%	88,2%
	86% - 98.8%	42.2% - 70.3%	93.5% - 100%	76.6% - 94.5%

Tabla 17. Validez de la IHQ como prueba diagnóstica de los distintos subtipos tumorales intrínsecos.

4.7. SEGURIDAD DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA DEL SUBTIPO INTRÍNSECO EN COMPARACIÓN CON EL GOLD STANDARD (PAM50)

Mientras que la sensibilidad y especificidad miden la validez de la IHQ como prueba diagnóstica los valores predictivos aportan mayor utilidad en la práctica clínica ya que nos permiten conocer, en función del resultado de IHQ, la probabilidad de aproximarnos al verdadero subtipo intrínseco (Tabla 18).

-Valor predictivo positivo

La definición de los subtipos tumorales mediante IHQ sobre la biopsia permite detectar un muy elevado número de pacientes con tumores con subtipo intrínseco Luminal A y HER2-enriched, aumentando esta capacidad predictiva en los pacientes Luminal A cuando se combinan las determinaciones de IHQ pre y post-QT (subtipo-IHQ compuesto). Sin embargo, la IHQ tiene una baja probabilidad de definir los verdaderos subtipos tumorales en el caso de tumores con subtipo intrínseco Basal-like y Luminal B sobre la biopsia. De los tumores definidos como Triple Negativo, aproximadamente casi un tercio no son tumores Basal-like y de los tumores definidos como Luminal B-like, casi la mitad no son verdaderos Luminal B. Este error es aún mayor si se realiza el estudio IHQ en la pieza quirúrgica y el empleo de ambas determinaciones IHQ no mejora la seguridad de la prueba para detectar estos dos subtipos tumorales.

Hay que destacar el bajo valor predictivo positivo de la IHQ cuando se realiza sobre la pieza quirúrgica en todos los subtipos excepto en el caso de los tumores HER2-enriched donde es del 100%.

- Valor predictivo negativo

El valor predictivo negativo de la IHQ es muy alto (>80%) cuando se realiza sobre la biopsia. Este porcentaje disminuye especialmente en el caso de los tumores Luminal A y Luminal B cuando se realiza sobre la pieza quirúrgica. Al emplear las dos determinaciones de IHQ (subtipo-IHQ compuesto) aumenta el valor predictivo negativo en los tumores Luminal B, manteniendo un elevado valor en los demás subtipos (valores superiores al 82%).

Subtipo-IHQ Biopsia trucut	Luminal A-like	Luminal B-like	HER2	Triple Negativo
Valor predictivo positivo	75,0%	52,8%	85,7%	68,2%
	46.8% - 91.1%	37% - 68%	48.7% - 97.4%	47.3% - 83.6%
Valor predictivo negativo	83,1%	87,8%	88,6%	92,7%
	72.2% - 90.3%	74.5% - 94.7%	79% - 94.1%	82.7% - 97.1%
Subtipo-IHQ Pieza Quirúrgica	Luminal A-like	Luminal B-like	HER2	Triple Negativo
Valor predictivo positivo	31.8%	37.5%	100%	61.1%
	16.4% - 52.7%	21.2% - 57.3%	34.2% - 100%	38.6% - 79.7%
Valor predictivo negativo	75,0%	69,0%	85,9%	91,7%
	60.6% - 85.4%	54% - 80.9%	75.4% - 92.4%	80.4% - 96.7%
Subtipo-IHQ Compuesto	Luminal A-like	Luminal B-like	HER2	Triple Negativo
Valor predictivo positivo	80,0%	50,0%	100,0%	62,5%
	49% - 94.3%	34.8% - 65.2%	34.2% - 100%	38.6% - 81.5%
Valor predictivo negativo	82,1%	89,3%	85,9%	90,0%
	70.2% - 90%	72.8% - 96.3%	75.4% - 92.4%	78.6% - 95.7%

Tabla 18. Seguridad en el empleo de técnicas de IHQ (subtipo-IHQ) para la clasificación de los subtipos tumorales intrínsecos.

4.8. EFICACIA DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA DEL SUBTIPO INTRÍNSECO EN COMPARACIÓN CON EL GOLD STANDARD (PAM50)

Con los resultados obtenidos, podemos afirmar que la determinación de IHQ sobre la biopsia tiene mejor capacidad diagnóstica del subtipo tumoral intrínseco que la determinación IHQ sobre la pieza quirúrgica en todos los subtipos tumorales (Tabla 19).

Por otro lado, la eficacia de la IHQ para determinar el subtipo tumoral intrínseco es mayor para el subtipo Basal-like que para el resto de los subtipos tumorales y a su vez, al igual que en el caso de los tumores con subtipo intrínseco Luminal o HER2-enriched, es mayor cuando se emplea sobre la biopsia, aunque en el caso de los tumores subtipo

Basal-like las diferencias son mucho menores que en el resto de los subtipos intrínsecos.

Eficacia IHQ Índice Youden	Luminal A-like	Luminal B-like	HER2	Triple Negativo
Subtipo-IHQ Biopsia Trucut	0,40	0,47	0,41	0,67
Subtipo-IHQ Pieza Quirúrgica	0,08	0,07	0,18	0,60
Subtipo-IHQ Compuesto	0,40	0,43	0,18	0,55

Tabla 19. Eficacia diagnóstica (Índice de Youden) de los subtipos tumorales definidos mediante IHQ (en la biopsia, pieza quirúrgica o mediante el empleo de ambas determinaciones en el subtipo-IHQ compuesto) para definir el subtipo intrínseco.

Por último, el empleo del subtipo-IHQ compuesto mejora la eficacia de la IHQ en la pieza quirúrgica en los tumores Luminal A y Luminal B, manteniendo similar eficacia que su determinación en la pieza quirúrgica en el resto de los subtipos.

4.9. ESTUDIO DE RESPUESTA TUMORAL AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE

4.9.1. RESPUESTA TUMORAL EN FUNCIÓN DEL SUBTIPO-IHQ Y SUBTIPO INTRÍNSECO: CLASIFICACIÓN SYMMANS Y CLASIFICACIÓN MILLER & PAYNE

La respuesta tumoral al tratamiento de quimioterapia, como se describe previamente, es valorada según los distintos sistemas de clasificación: clasificación de RCB (Residual Cancer Burden) de Symmans y clasificación de Miller & Payne.

Analizamos la respuesta tumoral en función del subtipo tumoral, tanto el definido mediante IHQ como el definido mediante el empleo de PAM50.

		Symmans		p-valor
		0-I	II-III	
Subtipo-IHQ	Luminal A-like	4 (14.3%)	24 (85.7%)	0,341
	Luminal B-like	14 (16.5%)	71 (83.5%)	
	HER2	7 (31.8%)	15 (68.2%)	
	Triple Negativo	9 (22.5%)	31 (77.5%)	
Subtipo intrínseco	Luminal A	3 (15%)	17 (85%)	0,285
	Luminal B	2 (8.7%)	21 (91.3%)	
	HER2-enriched	5 (35.7%)	9 (64.3%)	
	Basal-like	5 (26.3%)	14 (73.7%)	
	Normal	2 (14.3%)	12 (85.7%)	

Tabla 20. Respuesta tumoral medida mediante la Clasificación de Symmans en función del subtipo tumoral en la biopsia trucut.

Los tumores más sensibles a la QT medido mediante la clasificación de Symmans son los tumores definidos como HER2 y Triple negativo (IHQ) y los tumores HER2-enriched y Basal-like (PAM50), sin ser esta diferencia estadísticamente significativa. Por otro

lado, los tumores con peor respuesta al tratamiento son los tumores Luminal A y B (subtipo IHQ y subtipo intrínseco) (Tabla 20).

Al emplear la clasificación de Miller & Payne se observa también que los tumores que presentan mayor sensibilidad al tratamiento son los HER2 y Triple negativos (IHQ) y HER2-enriched y Basal-like (PAM50). Los tumores Luminal B (IHQ y PAM50) se caracterizan por presentar mayor tasa de sensibilidad intermedia. Los tumores Luminal A (IHQ y PAM50) se caracterizan por presentar mayor resistencia a la QT que los tumores Luminal B, sin ser esta diferencia estadísticamente significativa.

		Miller y Payne			p-valor
		Sensible	Sensibilidad intermedia	Resistente	
Subtipo-IHQ	Luminal A-like	8 (28.6%)	9 (32.1%)	11 (39.3%)	0,153
	Luminal B-like	23 (27.1%)	37 (43.5%)	25 (29.4%)	
	HER2	12 (54.5%)	6 (27.3%)	4 (18.2%)	
	Triple Negativo	12 (30%)	12 (30%)	16 (40%)	
Subtipo intrínseco	Luminal A	6 (30%)	7 (35%)	7 (35%)	0,33
	Luminal B	4 (17.4%)	11 (47.8%)	8 (34.8%)	
	HER2-enriched	6 (42.9%)	4 (28.6%)	4 (28.6%)	
	Basal-like	5 (26.3%)	7 (36.8%)	7 (36.8%)	
	Normal	7 (50%)	1 (7.1%)	6 (42.9%)	

Tabla 21. Respuesta tumoral en base a la Clasificación Miller & Payne en tres categorías: tumores Sensibles (4-5), con Sensibilidad intermedia(2-3) y Resistentes (1-2).

En nuestra serie, las pacientes con tumores HER2 (IHQ) y HER2-enriched (PAM50) se comportan como tumores muy sensibles o muy resistentes a QT, presentando bajo porcentaje de sensibilidad intermedia (Tabla 21).

		Respuesta tumoral (RCB)			p-valor
		Media \pm Desviación	Mediana (Rango intercuartílico)	Rango	
Subtipo-IHQ	Luminal A-like	2.5 \pm 1.3	2.4 (1.9 - 3.6)	0 - 4.7	0,556
	Luminal B-like	2.5 \pm 1.3	2.3 (1.6 - 3.6)	0 - 4.4	
	HER2	2.2 \pm 1.4	2.2 (1.1 - 3.4)	0 - 4.2	
	Triple Negativo	2.6 \pm 1.6	2.5 (1.4 - 4.2)	0 - 4.9	
Subtipo intrínseco	Luminal A	2.6 \pm 1.4	2.2 (1.6 - 3.8)	0 - 4.4	0,98
	Luminal B	2.6 \pm 1.2	2.9 (1.9 - 3.6)	0 - 4.4	
	HER2-enriched	2.2 \pm 1.6	2.3 (1.0 - 4.0)	0 - 4.4	
	Basal-like	2.6 \pm 1.7	3.2 (1.3 - 4.2)	0 - 4.5	
	Normal	2.6 \pm 1.5	2.3 (1.5 - 4.2)	0 - 4.4	

Tabla 22. Valor de RCB (clasificación de Symmans) en función subtipo tumoral en la biopsia trucut.

En nuestra serie, no se observa una diferencia de respuesta significativa medida mediante RCB entre los distintos subtipos tumorales definidos mediante IHQ o mediante PAM50 (Tabla 22).

Por último, tras analizar si existe mayor respuesta (RCB) en función del tratamiento recibido y el subtipo-IHQ, se observa que los tumores Triple Negativo presentan mayor respuesta a docetaxel que a adriamicina (Mediana RCB: 2,2 vs 3,7, $p=0,097$) sin observarse diferencias de respuesta entre los demás subtipos definidos mediante IHQ. Por otro lado, los tumores HER2-enriched (Mediana RCB: 0,6 vs 2,6, $p=0,065$) y Basal-like (Mediana RCB: 1,4 vs 3,6, $p=0,176$) son más sensibles al tratamiento con docetaxel, aunque estas diferencias tampoco son estadísticamente significativas.

4.9.2. RESPUESTA TUMORAL EN FUNCIÓN DEL SUBTIPO-IHQ Y SUBTIPO INTRÍNSECO: RESPUESTA COMPLETA PATOLÓGICA

En nuestra serie observamos pCR en el 10,7%, 9,1%, 13,6% y 17,1% de los tumores Luminal A-like, Luminal B-like, HER2 y Triple negativo, respectivamente (Figura 17). Al emplear el subtipo intrínseco las diferencias de respuesta son más llamativas, siendo del 10%, 8,3%, 21,4% y 21,1% en los tumores Luminal A, Luminal B, HER2-enriched y Basal-like, respectivamente (Figura 18).

Los tumores HER2 y Triple negativo definidos mediante IHQ se caracterizan por presentar una mayor pCR que los tumores luminales, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa en nuestra serie ($p=0,569$).

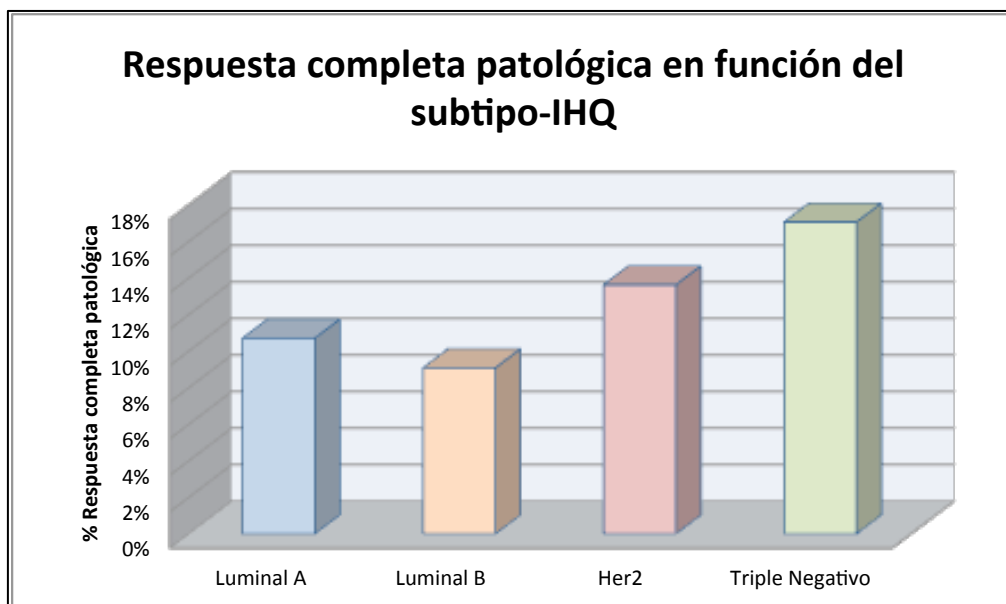


Figura 17. Respuesta completa patológica en función del subtipo-IHQ de la biopsia trucut.

Esta diferencia de respuesta en los tumores HER2 y Triple negativos es aún mayor en los tumores definidos como HER2-enriched y Basal-like mediante estudio genómico sin ser en este caso tampoco estadísticamente significativa ($p=0,598$).

Por último, tras valorar si el porcentaje de pCR varía en función del esquema de tratamiento recibido (docetaxel o adriamicina) en las 179 pacientes (con subtipo tumoral definido mediante IHQ), se observa que los tumores Triple negativo presentan porcentajes superiores de pCR con docetaxel (21% vs 12%) y los tumores HER2 con adriamicina (17% vs 10%). Estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p>0,5$) (Figura 19).

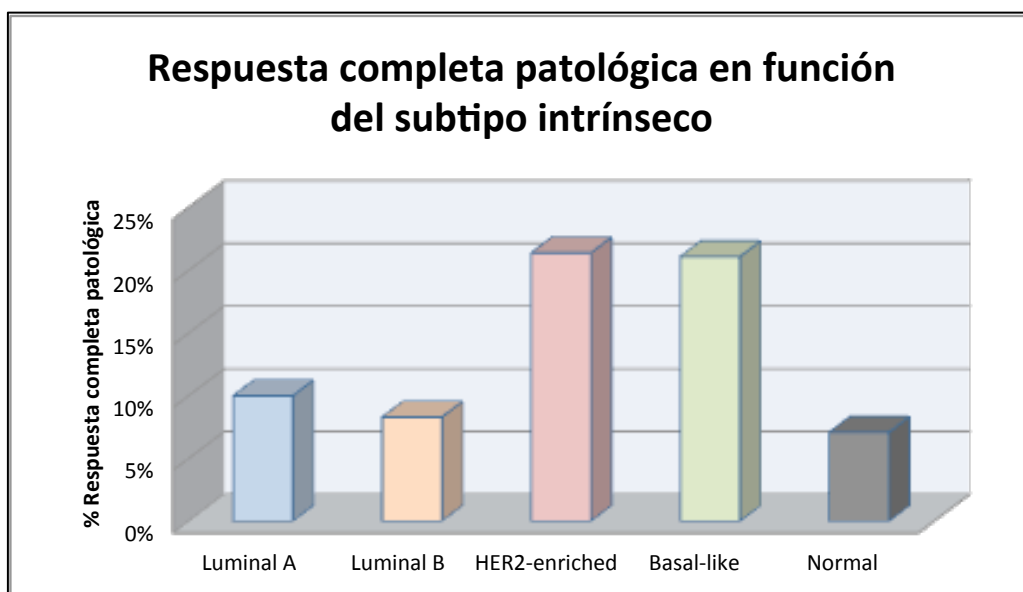


Figura 18. Respuesta completa patológica en función del subtipo intrínseco de la biopsia trucut.

Sin embargo, los datos de respuesta varían al definir los subtipos mediante PAM50 (Figura 20), observándose una mayor tasa de pRC a docetaxel que a la terapia con

adriamicina de los tumores HER2-enriched (50% vs 12%, $p=0,176$) y de los tumores Basal-like (33,3% vs 10%, $p=0,303$), sin ser esta diferencia tampoco estadísticamente significativa.

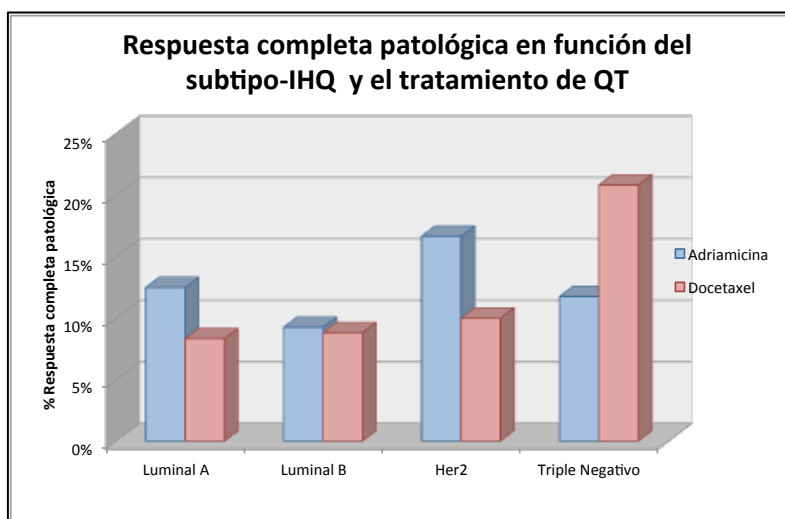


Figura 19. Respuesta completa patológica en función del subtipo tumoral (IHQ) en la biopsia trucut y tratamiento de QT recibido.

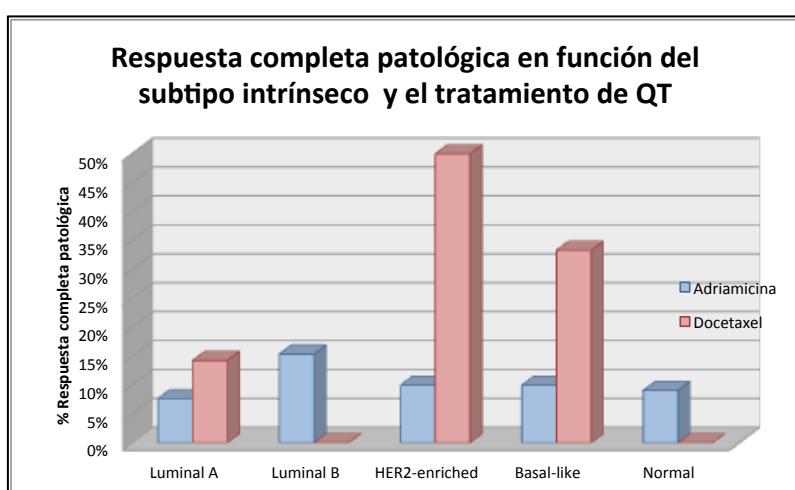


Figura 20. Respuesta completa patológica en función del subtipo tumoral intrínseco de la biopsia trucut y tratamiento de QT recibido.

5. DISCUSIÓN.....

5.1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que comprende múltiples tipos de tumores con características biológicas diferentes. En la actualidad, gracias al papel de la genómica, conocemos mejor algunas de estas características tumorales que nos permiten conocer el pronóstico y son predictivas de respuesta al tratamiento. El acceso al estudio genómico de la pieza tumoral no está estandarizado en todos los centros dentro de la práctica clínica habitual. Actualmente, el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado se basa en el estudio de los diferentes marcadores IHQ (RE, RP , ki67 y HER2) que, mediante empleo de técnicas más sencillas y accesibles, permiten aproximarnos a las características biológicas del tumor y determinar el tratamiento óptimo de las pacientes e incluso predecir la respuesta al mismo.

La QT neoadyuvante es el pilar del tratamiento de las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado y permite mejorar los resultados de la cirugía, aumentando la tasa de cirugías conservadoras, definir y estudiar nuevos factores predictivos de respuesta. Es necesario individualizar la terapia en función de las características biológicas de cada tumor con el objetivo de mejorar la tasa de respuestas y disminuir la morbilidad de los tratamientos innecesarios.

Debido a que sabemos que la respuesta patológica tumoral al tratamiento neoadyuvante está relacionada de manera directa con la evolución de la enfermedad, es clave realizar una medición estandarizada de la respuesta tumoral en el espécimen

quirúrgico. Por otro lado, es necesario conocer la incidencia y las causas de variabilidad de los marcadores IHQ con el fin de poder interpretarlas de manera adecuada para que dichos cambios, si ocurren, interfieran en el menor grado posible en el correcto manejo terapéutico de cada paciente.

En esta discusión pretendemos correlacionar los resultados obtenidos en nuestro estudio con lo publicado en la literatura, siguiendo para su exposición los objetivos iniciales:

- 1.- Conocer las características clinicopatológicas de nuestra serie y compararla con los datos existentes en la literatura para comprobar la reproducibilidad de los datos que se han obtenido.
- 2.- Valorar el cambio en el perfil IHQ (expresión individual de RE, RP, HER2 y Ki67), antes y después del tratamiento de QT neoadyuvante, y si este cambio tiene implicaciones terapéuticas y pronósticas. Comparar nuestros resultados con los descritos en otros estudios.
- 3.- Conocer el cambio de los subtipos-IHQ entre las dos muestras (biopsia y pieza quirúrgica), los porcentajes de cambio de dichos subtipos y explorar qué modificaciones de los parámetros IHQ condicionan dicho cambio.

4.- Valorar la concordancia entre el subtipo intrínseco y el subtipo-IHQ obtenido en la biopsia por trucut y el espécimen quirúrgico. Valorar si nuestros resultados son comparables a los de los estudios recientemente publicados con similar diseño.

5.- Valorar la validez del subtipo-IHQ compuesto, su relación con el subtipo intrínseco y su utilidad en la práctica clínica.

6.- Conocer la validez, seguridad y eficacia de la IHQ como prueba diagnóstica para definir el subtipo intrínseco de cáncer de mama en comparación con el gold standard (PAM50).

7.-Valorar si los subtipos genómicos y los subtipos-IHQ de la biopsia trucut predicen la respuesta al tratamiento de quimioterapia en nuestra serie y compararlo con los resultados de otros estudios.

5.2. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS

En nuestra serie, la edad media al diagnóstico es de 52 años, siendo el 25% de las pacientes menores de 40,5 años. La edad media al diagnóstico es similar a la descrita en otras series de QT neoadyuvante^(78-82, 84).

La mayoría de los tumores (81%) son carcinomas ductales infiltrantes y la segunda histología mas frecuente es carcinoma lobulillar infiltrante, como se describe en la literatura^(106, 107).

Al igual que se describe en algunos estudios de diseño similar, en nuestro estudio no se incluyeron pacientes en estadio I, a diferencia de algunos estudios similares que evaluaban el papel de la QT neoadyuvante^(72-77, 82). El estadio al diagnóstico es mayor a lo publicado en ensayos clínicos de características similares^(72-75, 80, 81), presentando la mayoría de las pacientes (97,2%) un estadio clínico IIB o superior, un tamaño tumoral medio al diagnóstico de 5,9 cm y sólo un 19,2% no presenta afectación axilar al inicio.

En cuanto a las características biológicas, el 64,2% de las pacientes de nuestra serie presenta positividad en la expresión de RH al diagnóstico. Un 61,5% presenta positividad para la expresión de RE, un 54,2% para el RP, similares resultados a lo descrito en estudios recientes que evalúan el papel del tratamiento de QT neoadyuvante^(77, 78, 80-82, 84).

En cuanto a la expresión de HER2, el porcentaje de tumores HER2 positivo (28,5%) es superior a los esperado según referencias de estudios anteriores de QT neoadyuvante en los que la proporción de población de pacientes con tumores HER2 positivo se encuentra en torno del 20%^(82, 84).

En nuestra serie, un alto porcentaje de tumores (69,3%) presenta un nivel alto de expresión de ki67 ($\geq 20\%$), muy superior a lo observado en estudios recientes que analizan el cambio de este parámetro tras QT neoadyuvante donde un 37-57% presenta niveles altos de expresión de ki67^(108, 109). Este hallazgo puede estar

relacionado con el hecho de que se incluyeron pacientes con tumores de mayor tamaño que lo descrito en otras series de QT neoadyuvante.

La mayoría de los tumores son moderadamente o pobremente diferenciados (96,6%), siendo el porcentaje de tumores bien diferenciado más bajo (3,4%) que el descrito en series de QT neoadyuvante de similares características^(78, 82, 84).

5.3. CAMBIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS EN LOS RE, RP, HER2 TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE: PAPEL DE LA QUIMIOTERAPIA. COMPARACIÓN DE NUESTRA SERIE CON LA LITERATURA

5.3.1. VARIACIONES EN LOS RE, RP Y HER2 EN MUESTRAS SUCESIVAS SIN INTERVENCIÓN FARMACOLÓGICA

En primer lugar, hemos querido analizar los datos existentes en la literatura respecto a las variaciones de los parámetros IHQ entre la biopsia y la pieza quirúrgica cuando la cirugía se realiza inmediatamente después de la biopsia inicial, sin tratamiento farmacológico preoperatorio. Este es el tratamiento estándar en los centros donde no se realiza QT neoadyuvante de manera habitual.

Los estudios iniciales realizados en los años 80 comparaban los resultados de RH en la biopsia y el espécimen quirúrgico mediante el empleo de técnicas de ensayo de unión a ligando para el estudio de los RH. En nuestra serie se han empleado técnicas de inmunotinción más modernas y reproducibles por lo que los datos no son

comparables. Sí cabe destacar que la mayoría de estos estudios clásicos describen cómo los niveles de RE y RP son menores en la pieza quirúrgica⁽¹¹⁰⁻¹¹²⁾.

A partir del año 2000 algunos estudios han analizado la variación de los RH empleando técnicas de IHQ más estandarizadas. Estos estudios han descrito una concordancia en los RE del 86-99% y en los RP del 82-97%⁽¹¹³⁻¹¹⁷⁾.

La pequeña variación que describen suele estar en relación con mayor expresión de RE y RP en la biopsia que en la pieza quirúrgica⁽¹¹⁵⁻¹²¹⁾.

En nuestra serie el 12% de las pacientes presentó cambio de estatus (de positivo a negativo o viceversa) de RE, el 22,2% del RP y el 14% de HER2. El 68,4% de las pacientes con cambio de estatus de RE y el 60% de las que lo presentó en los RP presentaron cambio de positivo a negativo. En la expresión de HER2 encontramos resultados similares. La mayoría (63,6%) de los pacientes que sufrió cambio de HER2 presentó ausencia de sobreexpresión en la pieza quirúrgica, siendo HER2 positivo en la biopsia inicial. Por lo tanto, se observó una tendencia al cambio de expresión de RE, RP y HER2 de positivo (biopsia por trucut) a negativo (pieza quirúrgica) que no fue estadísticamente significativa, probablemente en relación con el pequeño tamaño de la muestra.

Sin embargo, al evaluar los cambios de manera cuantitativa hemos observado que existe un descenso significativo de los valores absolutos de RP, siendo menores en el estudio de la pieza quirúrgica (mediana de expresión: 15% vs 6%, $p=0,049$).

Detallamos a continuación los datos publicados por las distintas series que analizan los cambios IHQ entre la biopsia y la pieza quirúrgica en ausencia de tratamiento neoadyuvante:

1.- C.S.Connor et al⁽¹¹⁵⁾: En este estudio de 2002, con 44 pacientes con cáncer de mama invasivo, se realiza estudio IHQ empleando los mismos protocolos para el estudio de RE, RP y HER2 en la biopsia y la pieza quirúrgica. La discordancia de RE fue sólo del 2%, superior en nuestra serie (12%). Se observó una discordancia de los RP del 18%, inferior a la descrita en nuestra serie. En el 87% de los casos discordantes de RP el resultado en la pieza quirúrgica fue negativo cuando previamente era positivo en la biopsia, mientras que en nuestra serie este porcentaje era menor (60%). La discordancia de HER2 se produjo en el 9% de los casos, menor a lo descrito en nuestra serie, siendo el cambio de estatus similar en ambos sentidos. En nuestro estudio, el 63,3% de las pacientes que presentaron cambio de HER2 sufrió la pérdida de HER2.

En este estudio se observan diferencias metodológicas respecto a nuestro trabajo. Se consideró que al menos un 10% de las células tumorales debían presentar tinción nuclear para RH para ser considerados positivos, HER2 se consideró negativo si era menor de 2+ y no se emplearon técnicas de HIS.

En este estudio, los autores explican que este cambio en los RP se podría explicar por diferentes razones entre las cuales están la heterogeneidad intratumoral, siendo mayor la positividad de RP en la periferia tumoral donde habitualmente se realiza la biopsia. Otras causas pueden ser las diferencias en el procesamiento, fijación y estudio de la muestra quirúrgica por parte del patólogo que podría condicionar una menor

positividad a RP, más sensibles a estos cambios.

2.- Y.S.Park et al⁽¹¹⁶⁾. En esta serie de 2009 se estudia la concordancia de los RH y HER2, empleando también técnicas de IHQ exclusivamente. El análisis se realizó sobre 104 pacientes con cáncer de mama considerándose como umbral de positividad de RH el 5% y también HER2 negativos aquellos con <3+. Se observó una concordancia de RE 99%, RP 97,1% y HER2 86,5%, superior a los datos de nuestra serie. Los casos que presentaron cambios en el RP lo hicieron presentando positividad en la biopsia y negatividad en la pieza quirúrgica, igual que sucedió en la mayoría de casos de nuestro estudio. La discordancia de HER2 se produjo en un porcentaje similar a nuestra serie (13,5%) y se trataba de casos 2+ que se interpretan como negativos sin la realización de FISH por lo que no es comparable con nuestros datos.

3.- G.B.Mann.et al⁽¹¹⁴⁾. Este estudio de 2005 pretendía estudiar los falsos negativos de la cirugía sobre la base de que la biopsia es mas reproducible porque el proceso de fijado habitualmente sigue un protocolo más estricto. Por ese motivo, este estudio aporta mas datos sobre la metodología de fijado en la biopsia y el espécimen y además las muestras son revisadas por 2 patólogos independientes. En caso de que existiesen diferencias superiores al 20% de expresión en RH o en más de 1 punto de HER2, ambos patólogos revisaban, siendo la metodología del estudio de la muestra riguroso.

El estudio de RE, RP y HER2 se realiza mediante técnicas de IHQ sobre las muestras de las 100 pacientes, considerándose como positivos para la expresión de RH aquellos tumores con al menos el 10% de células con tinción nuclear o los HER2 positivos: 3+. Se consideraron negativos aquellos casos sin expresión de RH y equívocos aquellos que presentaban porcentaje de expresión entre 0-10%.

Se observó concordancia de RE del 86%, similar a nuestros datos. Sin embargo, respecto a los RP hay mayor concordancia (83%) que en nuestra serie. Respecto a HER2, se observó la misma puntuación en el 80% de los casos y concordancia en el estatus en el 99% de los casos. La mayoría de casos discordantes de HER2 eran casos clasificados como 2+. Solamente un 1% de pacientes cambió de estatus de HER2, como se ha mencionado anteriormente, muy inferior a lo descrito en nuestras pacientes. En el 54% de las pacientes el resultado de puntuación de HER2 fue superior en la biopsia que en la cirugía. El 42% presentó la misma puntuación y solo el restante 4% presentó mayor puntuación en la cirugía.

La biopsia fue positiva, mientras que la pieza quirúrgica fue negativa, en el 13% de las pacientes para el RE, 11% en el RP frente al 8,2% y 13,3% descrito en nuestra serie.

Al analizar el grado de expresión (medido mediante Allred score) se observó de manera significativa, al igual que en nuestro estudio, un mayor nivel de expresión de RP en la biopsia respecto a la pieza quirúrgica. También se describe mayor nivel de expresión de RE, no observado en nuestra serie.

En este estudio los datos de cambio de RE y la existencia de mayores niveles de expresión en la biopsia los relacionan con una probable mayor expresión de RE en la periferia tumoral (zona donde habitualmente se realiza la biopsia) y con alteraciones en la fijación de la pieza quirúrgica, como ya se describía en el estudio publicado por Douglas et al⁽¹²²⁾.

4.- Burge et al⁽¹¹³⁾. Se observa una elevada concordancia entre las determinaciones de RE, RP y HER2 en las 87 pacientes estudiadas. En este estudio de 2005 se describe la metodología de procesamiento de la muestra de manera exhaustiva, el umbral de positividad de RH es del 10% y la determinación de HER2 se realiza mediante técnicas de IHQ y FISH, a diferencia de los estudios anteriores donde la determinación de HER2 se realizó exclusivamente mediante IHQ.

La concordancia en los RE fue del 95%, de los RP del 89% y del 96% en el caso de HER2 determinado por IHQ, siendo del 100% cuando es determinado por FISH, superior en todos los casos a lo observado en nuestro estudio. Al igual que en los estudios mencionados con anterioridad se objetiva una menor concordancia en la determinación de los RP que en los RE pero en este estudio los casos discordantes de RE y RP (un 5% y 11%, respectivamente) son la mitad de ellos positivos de inicio y negativos en la pieza quirúrgica y viceversa, por lo que en este caso no se observa una mayor expresión de RH en la biopsia que en la pieza quirúrgica.

Resultados similares se describen en la serie de Arnedos.et al⁽¹¹⁷⁾ de 2009 donde se estudiaron 336 pares de muestras y la concordancia de RE, RP y HER2 fue del 98,2%, 85% y 98,8%, respectivamente. En este estudio, al igual que en anterior, también se empleó FISH para la determinación de HER2. En este caso no se observaron mayores niveles de expresión en la biopsia que en la pieza quirúrgica de RH ni HER2. Esta alta concordancia probablemente es también consecuencia de la protocolizada metodología de este estudio.

La importancia de la metodología ya ha sido analizada en otros estudios y podría explicar estos resultados. Las diferencias en la fijación de la muestra, bien por defecto o por exceso, pueden condicionar falsos negativos. Retrasar la fijación de la muestra puede facilitar la degradación proteolítica de los RE y RP como se ha observado en algunos estudios. Por otro lado, no completar correctamente el proceso puede facilitar un déficit en la fijación de zona central y menor expresión de RH. Además, una fijación prolongada puede facilitar la disminución o ausencia de expresión de estos marcadores IHQ^(123, 124).

Por lo tanto, tras analizar los estudios mas actuales que han evaluado la concordancia de los RE, RP y HER2 entre la biopsia y la pieza quirúrgica, sin haber recibido tratamiento neoadyuvante, con un diseño y metodología más reproducible, podemos afirmar que sin tratamiento hay un muy bajo porcentaje de variabilidad en las determinaciones de RE, RP y HER2 y que cuando existen son probablemente secundarias a las alteraciones en el procesamiento, conservación o fijación de las muestras⁽¹²²⁾ y a la variabilidad dependiente del observador⁽¹²⁵⁾. Esta variabilidad es superior en el caso de los RP debido fundamentalmente a que éstos son más susceptibles a los daños producidos por las diferencias en el procesamiento de la muestra. La heterogeneidad tumoral⁽¹¹⁸⁾ podría explicar únicamente aquellos casos positivos en la pieza quirúrgica que no presentan inmunotinción en la biopsia, siendo este hallazgo muy infrecuente en nuestra serie y en las series publicadas de similar diseño.

5.3.2. VARIACIONES EN LOS RECEPTORES HORMONALES Y KI67 TRAS HORMONOTERAPIA NEOADYUVANTE

El cambio en la expresión de ki67 y RH en relación con la terapia endocrina ha sido descrita en varios estudios. En 1998, Bajetta et al⁽¹²⁶⁾ estudiaron la variación en los niveles de expresión de RE, RP y ki67 en 32 pacientes ancianas diagnosticadas de cáncer de mama hormono-sensible operable tras completar tratamiento neoadyuvante con tamoxifeno durante 6 semanas. Se observó que existía una disminución significativa de los niveles de expresión de RE, RP y ki67 ($p < 0,01$) entre las determinaciones realizadas en la PAAF inicial y la pieza quirúrgica.

En un estudio posterior publicado en 2003 por Miller et al⁽¹²⁷⁾ que analizó el cambio en RE, RP y ki67 tras tratamiento con hormonoterapia neoadyuvante (letrozol 2,5 mg, letrozol 10mg o tamoxifeno 20 mg al día) encontraron resultados similares. De las pacientes tratadas con Letrozol, todas presentaron descenso en los niveles de ki67 y un 95% descenso en RP, sin existir variaciones en la determinación del RE. En cambio, de las pacientes tratadas con tamoxifeno, la mayoría presentó descenso en los niveles de expresión de RE sin descenso de los niveles de expresión de RP.

En un estudio más reciente publicado en 2014 por Shimizu et al⁽¹²⁸⁾, 53 pacientes premenopáusicas con cáncer de mama localmente avanzado hormono-sensible sin sobreexpresión de HER2 recibieron tratamiento neoadyuvante con tamoxifeno y

acetato de goserelina durante 3 meses. En este estudio se observó una disminución significativa tanto de los niveles de RP como de los niveles de expresión de ki67 tras el tratamiento hormonal neoadyuvante ($p < 0,0002$). Además, el descenso en la expresión de RP se asoció con mejor respuesta tumoral ($p = 0,058$).

Con estos resultados podemos afirmar que la terapia hormonal induce un descenso en los niveles de expresión de RH (especialmente en el RP) y ki67 que puede tener implicaciones pronósticas.

5.3.3. VARIACIONES EN LOS RECEPTORES HORMONALES TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE: ¿RELACIONADOS CON EL TRATAMIENTO DE QUIMIOTERAPIA?

Vamos a analizar los datos de los estudios más relevantes en los que se evaluó el cambio de estatus y las variaciones en los niveles de expresión de los RH tras tratamiento con QT neoadyuvante, con el fin de valorar si la QT neoadyuvante podría estar relacionada con dichas variaciones.

Recientemente, en el año 2011, se publicó un metaanálisis donde se evaluaba los resultados de 32 estudios (prospectivos y retrospectivos) que investigaban la concordancia de los receptores hormonales (RE y RP) y HER2 tras el tratamiento con QT neoadyuvante⁽¹²⁹⁾.

Aproximadamente la mitad de los estudios revelaban un cambio en la determinación de RE y RP del 2,5-17% y 5,9-51,7%, respectivamente. Los estudios en los que las determinaciones eran más estables se caracterizaban por ser estudios de menor potencia estadística. En la mayoría de los estudios, en cualquier caso, el RP presenta mayor variabilidad que la determinación de los RE, al igual que se observa en nuestros datos. Respecto a HER2, se observó una concordancia muy alta cuando la determinación se realizaba mediante FISH. Se describe pérdida de sobreexpresión de HER2 de hasta un 40% en los pacientes tratados con trastuzumab durante el tratamiento de QT neoadyuvante⁽¹²⁹⁾.

En este metaanálisis se incluyen estudios que comparan cambios en niveles de expresión y/o cambio de estatus de los RE, RP y HER2 antes y después del tratamiento neoadyuvante y los describiremos por separado para compararlo con nuestros resultados.

El cambio en los niveles de expresión de RE se analizó en 10 estudios encontrándose un descenso de expresión en 4 de ellos, hallazgo que no se ha producido en nuestra serie⁽¹³⁰⁻¹³³⁾.

Cuando el análisis en los distintos estudios hace referencia al cambio de estatus de RE, estudiado en 15 estudios, 8 estudios encontraron diferencias significativas^(130, 134-138).

Este cambio de estatus se traduce en su mayoría en un cambio de RE de positivo a negativo como se describe en el estudio prospectivo con mayor número de pacientes⁽¹³⁴⁾ y de acuerdo con los resultados en la determinación de RE en nuestra

serie, donde se observa un mayor porcentaje de pacientes en los que el cambio de estatus es de positivo a negativo que en sentido opuesto (68,4% vs 31,6%) aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Este hecho puede ser consecuencia del bajo número de pacientes como sucede en los estudios con similar resultado al nuestro incluidos en el metaanálisis.

En relación con los RP son 7 los estudios que incluyen el análisis de los cambios en los niveles de expresión de estos receptores^(130, 131, 133, 139-142).

Se detectó cambio en dichos niveles en 4 de ellos. En el único estudio prospectivo y a su vez el de mayor tamaño⁽¹³³⁾ se observó un 58% de descenso en el valor absoluto de RP. Estos resultados son similares a los descritos en nuestro trabajo en el que observamos un 60% de descenso medio en los niveles de RP, estadísticamente significativo.

Respecto al cambio de estatus de RP tras el tratamiento de QT neoadyuvante, ha sido estudiado en 13 estudios encontrándose discordancia en las 2 determinaciones de manera significativa en 8 de ellos^(109, 130, 135-138, 143, 144).

Los estudios prospectivos que encontraron diferencias en el estatus de RP son estudios de mayor tamaño que los estudios que no detectaron dichas diferencias^(134-136, 138). Estas diferencias fueron de 5,9-51,7% según los estudios, mientras que en nuestra serie las diferencias detectadas fueron del 22,2%. En los estudios que detectaron diferencias significativas en el estatus de RP, el cambio de estatus más frecuente es de

positivo a negativo tras la terapia neoadyuvante, como se observa en el 60% de los casos de nuestra serie.

Para explicar estos cambios IHQ tras la QT neoadyuvante han surgido diferentes hipótesis entre las que se encuentran:

- Quimiosensibilidad de sólo algunas células tumorales frente a la resistencia de otras pertenecientes al mismo tumor en relación con la existencia de heterogeneidad intratumoral de la cual hablaremos más detalladamente en el apartado 5.4.
- Cambio en el estatus del receptor como mecanismo de supervivencia de las células tumorales.
- Menor expresión de receptores hormonales en la pieza quirúrgica debido a una insuficiencia ovárica asociada al tratamiento con QT en mujeres premenopáusicas que podría explicar la menor expresión de RH, dependiente de estrógenos. En mujeres posmenopáusicas también podría darse este efecto al existir una supresión de las glándulas adrenales secundaria a QT y esteroides.

5.3.4. VARIACIONES EN LOS RECEPTORES HORMONALES TRAS QT NEOADYUVANTE: IMPLICACIONES PRONÓSTICAS

Algunos de los estudios que han evaluado el cambio en los RH también han explorado las implicaciones pronósticas de este cambio⁽¹⁴⁵⁾ y han sugerido que puede existir un menor beneficio de la terapia hormonal en pacientes con cambio de estatus en RH de positivo a negativo. Sin embargo, Tacca et al⁽¹⁴⁶⁾ y Hirata et al⁽¹³⁷⁾ no hallaron diferencias en SLE y SG en estas pacientes, aunque sí describen que las pacientes con cambio en sentido contrario (de negativo a positivo) parecen tener mejor pronóstico.

Más recientemente se han publicado dos estudios en población asiática que también han evaluado las implicaciones pronósticas del cambio del RH tras QT neoadyuvante. El primero de ellos es un estudio retrospectivo de 267 pacientes con cáncer de mama estadio II-III y enfermedad residual tras QT neoadyuvante. Se produjo un cambio de estatus en RH en el 15,7% de las pacientes, cambio de RE en el 21,3% y de RP en el 20,2%. Es interesante de este estudio el análisis en cuatro grupos (Figura 21):

- Grupo A: formado por las pacientes que no presentan cambios en el estatus de RH manteniéndose positivo en las dos determinaciones.
- Grupo B: las pacientes presentan un cambio de estatus de positivo a negativo en RH.
- Grupo C: las pacientes presentan un cambio de estatus de negativo a positivo.
- Grupo D: el status de los RH es negativo en ambas determinaciones.

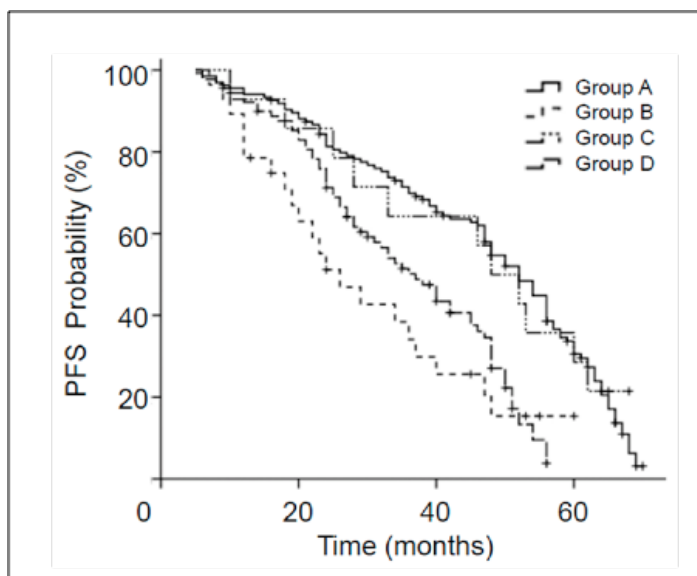


Figura 21. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad en función del cambio de estatus en los receptores hormonales tras QT neoadyuvante. Grupo A: ambas determinaciones positivas. Grupo B: cambio de estatus RH+/- . Grupo C : cambio de estatus RH-/+ . Grupo D: ambas determinaciones con RH negativo. Fuente: Tan QX et al. Prognostic value of hormone receptor status conversion following neoadjuvant chemotherapy in a series of operable breast cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(7):4086-94.

Todas las pacientes con alguna de las determinaciones positivas recibió terapia hormonal y se observó que aquellas que sufrían un cambio de positivo a negativo presentaban peor pronóstico que las pacientes con RH positivos en ambas determinaciones, que aquellas en las que el cambio era a la inversa y que aquellas pacientes con tumores con ambas determinaciones negativas⁽¹⁴⁷⁾.

En el segundo estudio, publicado en 2015, se analiza de manera prospectiva el impacto en el pronóstico de este cambio en 423 pacientes que presentan enfermedad residual tras QT neoadyuvante (Figura 22). El 13% de las pacientes presentó cambio de RH de

positivo a negativo, el 5,4% presentó el cambio en sentido contrario. La pérdida de RH tras la QT neoadyuvante, se relacionó con una menor supervivencia⁽¹⁴⁸⁾.

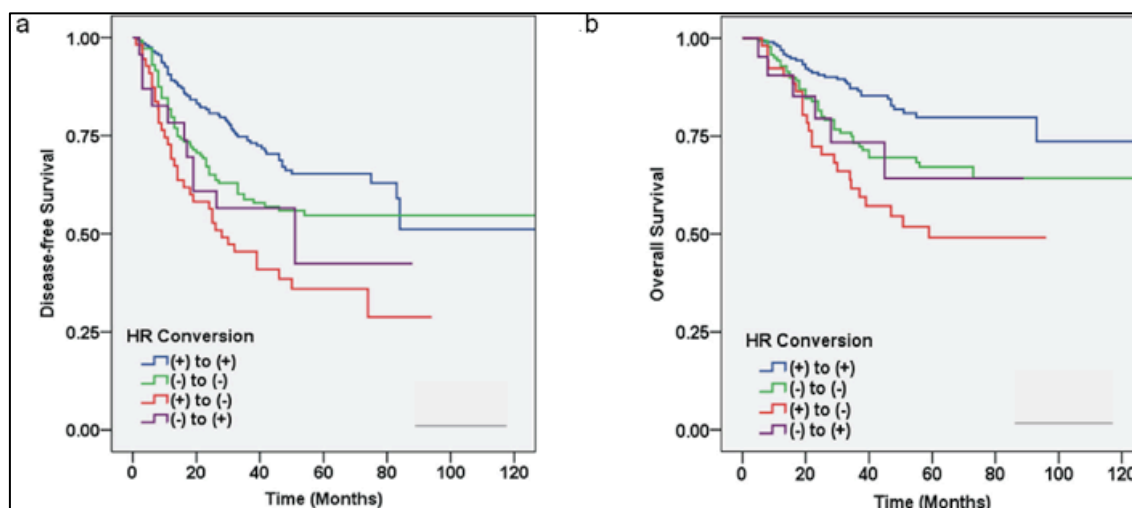


Figura 22. Curvas Kaplan-Meier de Supervivencia libre de enfermedad (a) y supervivencia global (b) relacionada con el cambio de estatus de RH. Fuente: Jin X et al. Prognostic value of receptor conversion after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: a prospective observational study. *Oncotarget*. 2015;6(11):9600-11.

5.3.5. CAMBIOS EN LA SOBREEXPRESIÓN Y/O AMPLIFICACIÓN DE HER2 TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE

Como hemos revisado en el apartado anterior, la determinación de HER2 cuando se realiza por FISH tiene una concordancia próxima al 100% entre la biopsia y la pieza quirúrgica, como se describe en los estudios que no emplean tratamiento neoadyuvante. En nuestra serie se produce un cambio de estatus de HER2 en un 14% de pacientes y en su mayoría este cambio es en forma de pérdida de

sobreexpresión/amplificación de HER2 (63,6%). De todas las pacientes HER2 positivas inicialmente prácticamente un tercio de ellas (29,8%) sufre este cambio de estatus.

Cabe destacar que en nuestra serie ninguna paciente recibió tratamiento con trastuzumab neoadyuvante dado que no estaba contemplado dentro del ensayo clínico y además las pacientes iniciaron QT neoadyuvante antes del año 2009, cuando dicho tratamiento aun no era habitual.

De los 19 estudios con QT neoadyuvante sin trastuzumab incluidos en el metaanálisis que analizaron el cambio de HER2, solo 7 utilizaron técnicas de HIS como en nuestro estudio. De estos estudios 7 estudios con QT neoadyuvante sin trastuzumab que emplearon técnicas de HIS para estudiar HER2, 6 de ellos concluyeron que no había cambios significativos de HER2, siendo la mayoría de estos estudios prospectivos ^(134, 135, 138, 140, 149, 150). Sin embargo, el mayor estudio retrospectivo, que incluyó 368 pacientes, describe un cambio del 9,5% en su mayoría por pérdida de la amplificación de HER2 (63,2%), similar a nuestro resultado⁽¹³⁷⁾.

Por otro lado, de los 12 estudios del metaanálisis que solo realizaron estudio de HER2 mediante IHQ, la mitad de ellos reportaron cambios de HER2 significativos probablemente en relación con menor reproducibilidad la técnica respecto a las técnicas de HIS.

La influencia de la terapia con trastuzumab ha sido investigada en tres estudios prospectivos reportados en el metaanálisis que incluyeron un bajo número de

pacientes y sin rama control (QT sin terapia con trastuzumab). En dos de estos estudios se objetivó una pérdida de amplificación de HER2 de un 32% y 43% en los pacientes con enfermedad residual. A diferencia del tratamiento de QT parece que la terapia con trastuzumab sí se asocia con un descenso en la expresión de HER2 en la muestra quirúrgica⁽¹⁵¹⁻¹⁵³⁾.

Dichos resultados apuntan a una ausencia de cambio de HER2 tras el tratamiento con QT sin trastuzumab cuándo éste es determinado mediante IHQ y FISH, mientras que los hallazgos de nuestra serie sí detectan diferencias de expresión/amplificación de HER2 tras la QT neoadyuvante a pesar de haber empleado las mismas técnicas diagnósticas.

Estudios posteriores a la publicación del metaanálisis apoyan nuestros datos como los estudios publicados por Guarneri et al⁽¹⁵⁴⁾ en 2013 y por Yang et al⁽¹⁵⁵⁾ en 2012 donde se observa un descenso en la expresión de HER2 (determinado mediante IHQ y FISH) tras el tratamiento con QT neoadyuvante. En este primer estudio, a diferencia de los anteriores, sí existe una rama control que recibe QT sin trastuzumab. De los 107 pacientes incluidos en este estudio prospectivo, 40 pacientes fueron tratados solo con QT y 67 con QT y trastuzumab presentando un 40% y 14,7% de pérdida de amplificación de HER2, respectivamente ($p=0,019$). El porcentaje de pérdida de HER2 en la rama tratada con QT es incluso superior al de nuestro estudio donde un 29,8 % de tumores HER2 positivos sufren pérdida de HER2 tras la QT neoadyuvante.

Por otro lado, algunos estudios han relacionado el cambio en los RH con el cambio de HER2 encontrando niveles de expresión de HER2 menores cuando existe aumento de expresión de RE y de la misma manera cuando el cambio es en sentido contrario, tras tratamiento con QT neoadyuvante^(137, 140, 142, 149, 156, 157). A su vez, la pérdida de HER2 parece asociarse a un aumento en los niveles de RE en pacientes tratados también con trastuzumab⁽¹⁵¹⁾.

Esta combinación de cambios apoya la teoría de que el cambio en la expresión de estos receptores está inducido por la terapia neoadyuvante y no son debidos a otras causas como las variaciones en las técnicas de laboratorio o la variabilidad del observador.

Pero esta asociación de cambios no sucede en nuestra serie. De las 22 pacientes que presentan cambio en HER2, solamente 3 de ellas presentan cambio en RH y este cambio no sigue un patrón fijo. De estas 3 pacientes, 2 pacientes eran inicialmente HER2 negativo produciéndose ganancia de HER2 asociada a la pérdida de expresión de los RH, similar a lo descrito en la literatura. Sin embargo, en la otra paciente que inicialmente era HER2 positivo, la pérdida de HER2 se asocia a la pérdida de expresión de RH en la pieza quirúrgica, lo contrario a lo que deberíamos esperar según lo descrito anteriormente. Estos datos podrían explicarse como consecuencia del pequeño tamaño muestral y el escaso número total de casos HER2 positivo que no permite extrapolar los datos a la población general.

5.4. NIVELES DE EXPRESIÓN DE KI67 TRAS QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE

En nuestro estudio, casi el 40% de las pacientes presentan un descenso significativo de los valores de ki67 tras el tratamiento con QT neoadyuvante asociado a un cambio de estatus significativo. Este cambio es de nivel alto de expresión a nivel bajo de expresión (<20%) presentando valores significativamente menores de la determinación en la pieza quirúrgica (mediana de expresión: 30% vs 7%, $p<0,001$). El descenso de los niveles de ki67 es más pronunciado en las pacientes con tumores Luminal B-like en la biopsia, de manera significativa. Además, al analizar los cambios de subtipo-IHQ tras la QT neoadyuvante, el descenso de ki67 es la causa del cambio de subtipo-IHQ en el 88% de los pacientes que sufren cambio de subtipo Luminal B-like a Luminal A-like, cambio de subtipo IHQ más frecuente.

Uno de los primeros estudios que reflejó resultados similares fue el publicado en el año 2000 por Schneider et al⁽¹⁴¹⁾ donde tras estudiar la variabilidad de la expresión de RE, RP, HER2 y ki67 en 48 pacientes tratadas en un centro español, se observó que, junto con el grado tumoral, el único parámetro que presentó un descenso significativo tras la QT neoadyuvante fue el índice de ki67 ($p<0,05$).

Otros estudios más recientes apoyan estos hallazgos como el publicado en este mismo año en *Annals of Oncology* con 904 pacientes del Instituto Europeo de Milán. Se evaluó igualmente la variabilidad de RE, RP, HER2 y ki67 identificándose un descenso en los valores de RP presentando el 67% de las pacientes con niveles altos de expresión un descenso significativo de los mismos. En el caso de ki67, el 40% de las pacientes con

niveles altos de expresión presentaron niveles inferiores al 20% en la pieza quirúrgica, resultados superponibles a los de nuestro estudio. Además, en este trabajo se observó que este descenso en los RP y ki67 se asocia a mejor SLE y SG de manera significativa. (HR: 0,73; IC 95%: (0,54-1,00) y HR: 0,52; IC 95% (0,40-0,68), respectivamente)⁽¹⁵⁸⁾.

Estudios de similares características avalan estos resultados como el publicado en 2013 por Matsubara et al⁽¹⁵⁹⁾ donde se analiza de manera retrospectiva el comportamiento de ki67 en 385 pacientes tratadas con QT neoadyuvante, objetivándose similares resultados. En este estudio, se analizó este cambio de ki67 y su repercusión pronóstica en los distintos subtipos clínicos de cáncer de mama (Luminal A-like, Luminal B-like, HER2 y Triple negativo), observándose un mayor descenso de ki67 en los pacientes con tumores Luminal B-like. En este estudio, el descenso de ki67 se comporta como un factor pronóstico independiente en las pacientes con subtipo Luminal B-like, HER2 o Triple negativo. En nuestro estudio, las pacientes con subtipo Luminal B-like también presentan un mayor descenso medio en los niveles de ki67 respecto a los demás subtipos tumorales, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

Un estudio asiático mas reciente⁽¹⁶⁰⁾ analiza los cambios en RH y ki67 en 103 pacientes de similares características hallando un descenso significativo de ki67 tras el tratamiento de QT neoadyuvante (39.7% vs 24.1%, $p < 0,001$) que también varía en función del subtipo tumoral, aunque en este estudio es mayor en los tumores HER2 y Triple Negativo. Además, en este trabajo las pacientes tratadas con taxanos presentan un descenso de ki67 significativamente mayor, hecho que no refleja nuestra serie ya

que no existen diferencias significativas en el descenso de ki67 entre las pacientes tratadas con adriamicina o docetaxel.

Para explicar la probable causa del descenso de los niveles de ki67 tras el tratamiento con QT neoadyuvante vamos a revisar previamente los modelos de carcinogénesis que explican la existencia de heterogeneidad intratumoral⁽¹⁶¹⁾ (Figura 23).

1.- Modelo tradicional o estocástico: postula que una célula del tejido normal adquiere mutaciones que le confieren capacidad de supervivencia y división acumulándose nuevas mutaciones y, mediante la selección de clones con mayor capacidad de supervivencia, estas células alcanzan el estado de célula tumoral que dará lugar al tumor (formado por uno o varios clones). Según este modelo, cualquier célula del tumor puede dar lugar a nuevas células tumorales.

2.- Modelo jerárquico: Este modelo defiende que la existencia de una célula madre pluripotencial da lugar a células en distintos estadios de diferenciación celular. Estas células madre serían las únicas con capacidad de mantenerse y reproducirse de manera indefinida. Las células madre tumorales están sujetas a la evolución clonal pudiendo acumular alteraciones genómicas, coexistiendo en este caso los dos modelos de carcinogénesis.

En el año 2009 en base a los resultados del estudio publicado por Lim et al⁽¹⁶²⁾, Prat y Perou⁽¹⁶³⁾ proponen un modelo de carcinogénesis en cáncer de mama basado en el

modelo jerárquico donde se explica el origen de los distintos subtipos intrínsecos de cáncer de mama (Figura 24).

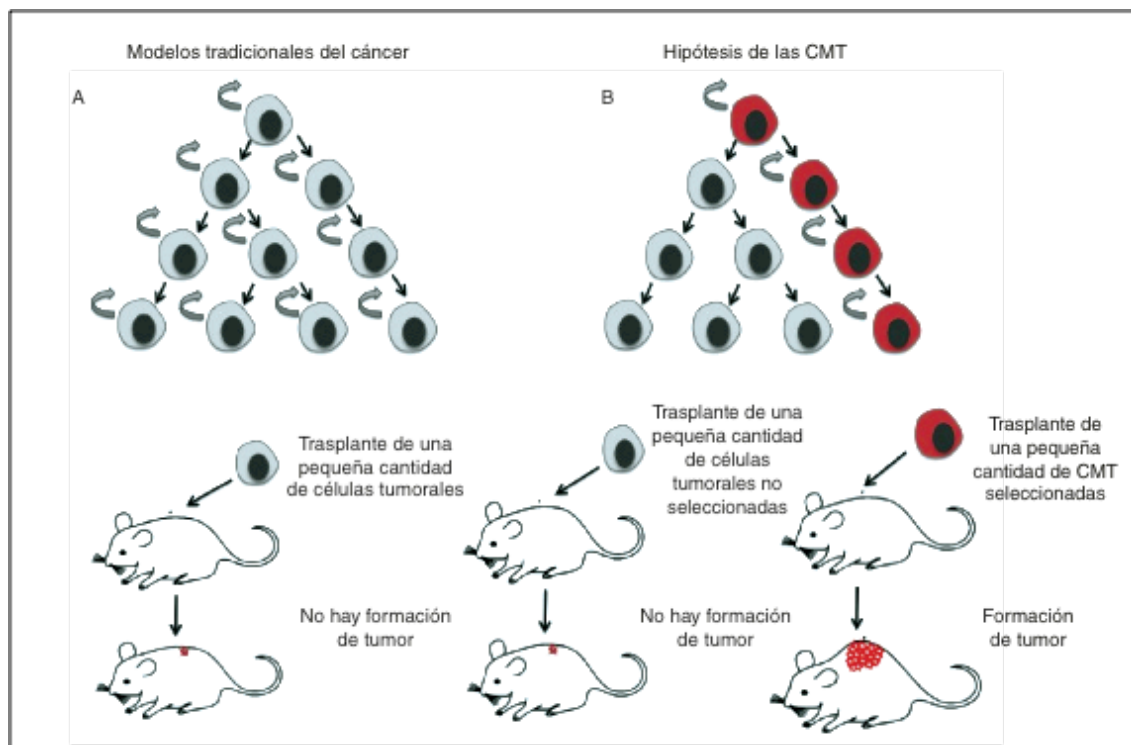


Figura 23. Representación gráfica de los modelos del cáncer. A: Modelo tradicional o estocástico. B: Modelo jerárquico de las células madre tumorales (CMT). Fuente: Eguiara A et al. Células madre tumorales: una diana terapéutica en el cáncer de mama. Revista de Senología y Patología Mamaria. 2012;25(03):107-15.

Ambos modelos de carcinogénesis pretenden explicar la existencia de heterogeneidad intratumoral. Hay suficiente evidencia científica para afirmar que los tumores presentan heterogeneidad genética y están formados por diferentes clones tumorales, con predominio de alguno de ellos sobre el resto⁽¹⁶⁴⁻¹⁶⁷⁾. La QT selecciona clones sensibles de características similares.

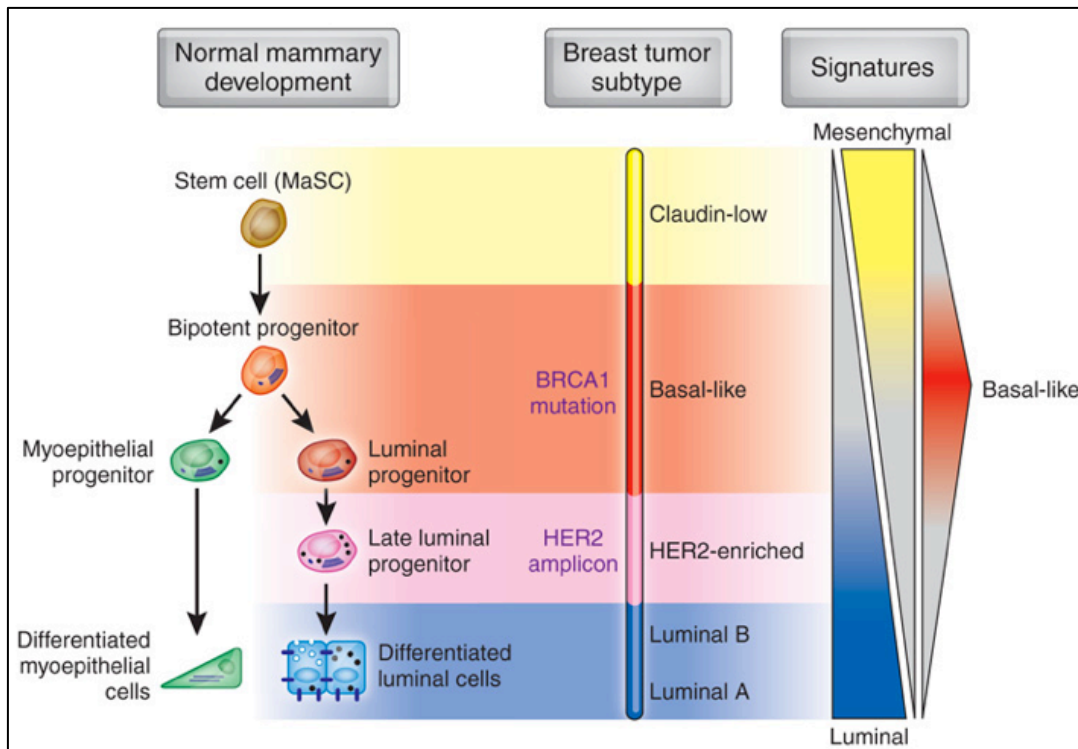


Figura 24. Subpoblaciones celulares del tejido mamario normal y células potenciales que dan origen de los distintos subtipos intrínsecos de cáncer de mama. Fuente: Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. Nat Med. 2009;15(8):842-4.

Ki67 es un antígeno proteico nuclear expresado en todo el ciclo celular excepto en G0 y es un fiel marcador de la actividad proliferativa. Los clones con un alto índice ki67 presentan una mayor respuesta a la QT que los que presentan un bajo índice ki67, ya que este marcador es un parámetro indirecto de multiplicación celular que le confiere al tumor mayor sensibilidad a la QT⁽¹⁶⁸⁻¹⁷⁰⁾. Este hecho explicaría nuestros resultados en los que existe una disminución significativa de los valores de ki67 tras la QT neoadyuvante, probablemente en relación con la mayor respuesta de los clones con mayor índice ki67, y como consecuencia menor residuo tumoral de los clones con alto índice ki67 tras el tratamiento neoadyuvante.

5.5. CONCORDANCIA ENTRE LOS SUBTIPOS INTRÍNSECOS Y LOS SUBTIPOS DEFINIDOS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

En nuestra serie, se empleó PAM50 para determinar los subtipos intrínsecos sobre la biopsia por trucut. El 48% de los tumores al diagnóstico presentó subtipo intrínseco Luminal, el 16% HER2-enriched y el 21% Basal-like, detectándose un mayor porcentaje de pacientes con subtipo intrínseco Luminal respecto a lo publicado en otros estudios⁽⁶³⁾.

En 2013 el panel de expertos de St.Gallen publicó el documento de consenso donde se propuso que los parámetros clínico-patológicos estándar (estudios de IHQ de los RE, RP, ki67 y HER2) pueden definir subtipos clínicos subrogados, estableciéndose unos criterios para la clasificación del cáncer de mama en subtipos basados solamente en los resultados de IHQ (Tabla 23)⁽⁶⁸⁾.

En nuestra serie, aplicando los criterios de St.Gallen, la distribución de los tumores fue de un 16% Luminal A-like, un 49% Luminal B-like, un 12% HER2 y un 23% Triple Negativo.

Tras comparar en nuestra serie el subtipo intrínseco con el subtipo-IHQ de la biopsia y el subtipo quirúrgico se observa un moderado grado de concordancia del subtipo intrínseco con el subtipo-IHQ de la biopsia por trucut ($K=0,499$) y un pobre grado de concordancia con el subtipo-IHQ de la pieza quirúrgica ($K=0,222$).

Tabla 23. Subtipos tumorales definidos mediante IHQ como subrogados de los subtipos intrínsecos definidos mediante estudio genómico (PAM50). Fuente: Goldhirsch et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. Ann Oncol. 2013;24(9):2206-23.

- Baja sensibilidad de la IHQ (45%) para detectar los tumores Luminal A (PAM50) cuando se realiza sobre la biopsia. Un 40% de tumores Luminal A (PAM50) son clasificados como Luminal B-like mediante IHQ.

- Baja sensibilidad (42,9%) de la IHQ para detectar los tumores HER2-enriched (PAM50). El 42,9% de los tumores HER2-enriched (PAM50) son clasificados como Luminal B-like mediante IHQ.

El pobre grado de concordancia del subtipo-IHQ de la pieza quirúrgica y el subtipo intrínseco es debido a :

- Al igual que en el caso de las determinaciones sobre la biopsia: baja sensibilidad de la IHQ para detectar los tumores Luminal A (38,9%) y HER2-enriched (18,2%). Un 50% de los tumores Luminal A son clasificados como Luminal B-like y un 45,5% de los tumores HER2-enriched como Luminal B-like.
- A diferencia de lo que ocurre cuando se realizan las determinaciones sobre la biopsia, la IHQ presenta baja sensibilidad para detectar los tumores Luminal B (40,9%). El 45,5% de los tumores Luminal B son clasificados como tumores Luminal A-like en la pieza quirúrgica.

Son muy pocos los estudios que han valorado el grado de concordancia entre los subtipos definidos mediante IHQ y estudio genómico. Los estudios que más se aproximan a nuestro diseño son los siguientes:

En primer lugar, el estudio de Prat et al⁽⁶³⁾ publicado en 2011. Se trata de un estudio que recopila los datos anatomopatológicos y moleculares de la misma muestra tumoral de aproximadamente 400 pacientes con cáncer de mama, clasificados en subtipos intrínsecos mediante el empleo de PAM50, que provienen de las bases de datos UNC337⁽⁵³⁾ y MDACC133⁽¹⁷¹⁾.

Para poder comparar los datos emplearemos los subtipos-IHQ e intrínsecos de la biopsia de nuestras pacientes dado que ambas determinaciones (IHQ y PAM50) se han realizado en la misma muestra.

Una diferencia con nuestro estudio es que en el estudio de Prat no se define exactamente la población con subtipo Luminal A-like y Luminal B-like ya que los tumores son clasificados mediante la existencia o ausencia de expresión de RE y HER2 sin incluir niveles de RP ni ki67, que sí se han tenido en cuenta en nuestro estudio. El estudio de Prat se publicó en 2011, antes de definirse los criterios de St.Gallen sobre los subtipos subrogados basados en IHQ.

Debido a esta razón compararemos los subtipos definidos por Prat como RH+/HER2+ o RH+/HER2- agrupados como subtipo Luminal-like con nuestros subtipos Luminal A/B-like , los RH-/HER2+ con los HER2 de nuestro estudio y los tumores RH-/HER2- con los Triple negativo de nuestra serie (Figura 25).

Los tumores con subtipo intrínseco Luminal A en nuestra serie son un 85% definidos como Luminal-like mediante IHQ, un 5% como HER2 y un 10% como Triple Negativo (Figura 26), similares resultados a los publicados en esta serie de Prat donde el 94% eran definidos como tumores Luminal-like, el 2% como HER2 y el 5% como Triple Negativo.

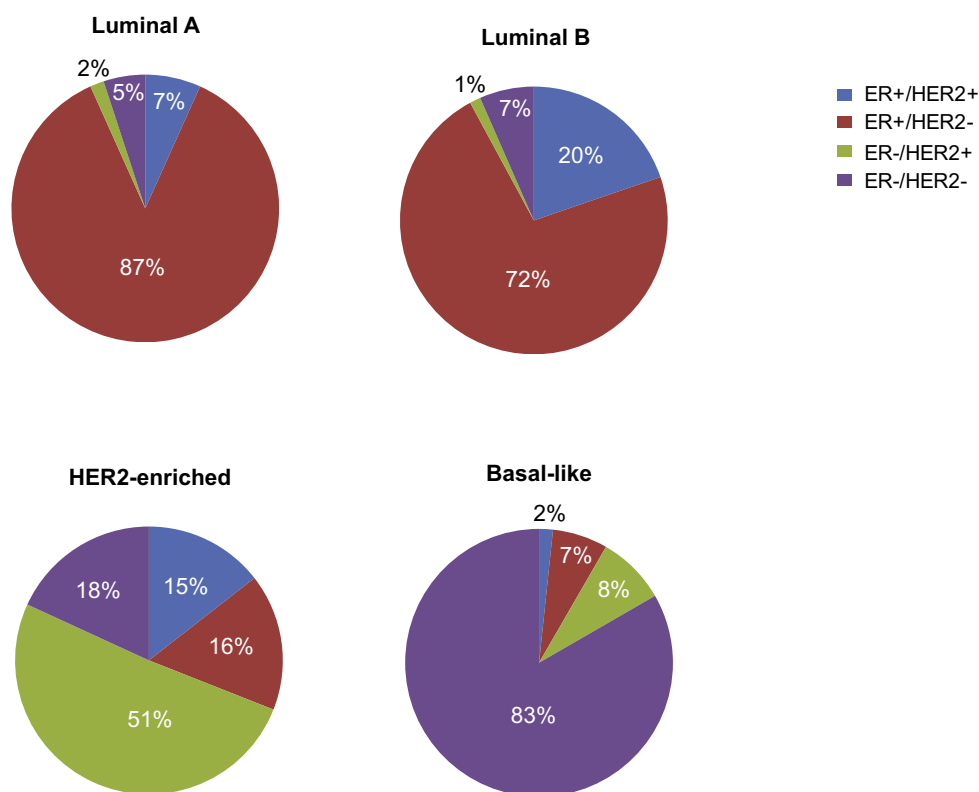


Figura 25. Concordancia entre el subtipo intrínseco y el subtipo definido mediante IHQ en los tumores Luminal A, Luminal B, HER2-enriched y Basal-like (PAM50). Adaptada de: Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. Mol Oncol. 2011;5(1):5-23.

Respecto a los tumores con subtipo intrínseco Luminal B, un 87,5% en nuestra serie se definieron mediante IHQ como tumores luminales y un 12,5% fueron clasificados como tumores Triple Negativo (Figura 27). En este caso, los resultados también son muy similares a los publicados por Prat donde un 82% fue clasificado mediante IHQ como Luminal-like, un 7% como Triple Negativo y solo un 1% como HER2.

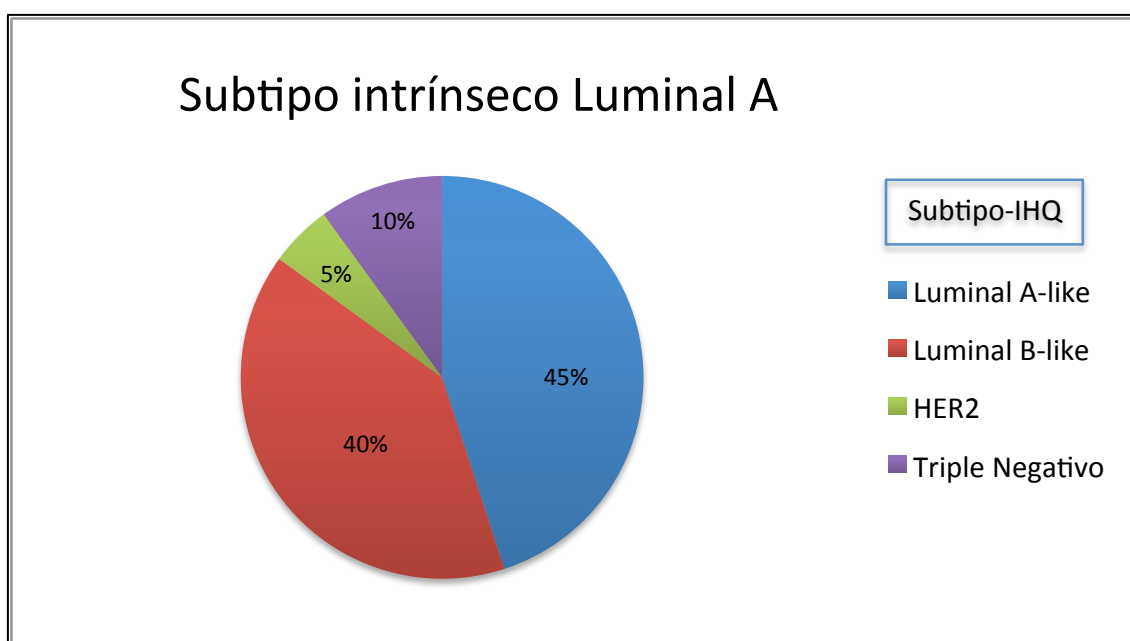


Figura 26. Concordancia entre el subtipo-IHQ definido en la biopsia por trucut y el subtipo intrínseco en las pacientes con tumores Luminal A en nuestra serie (PAM50).

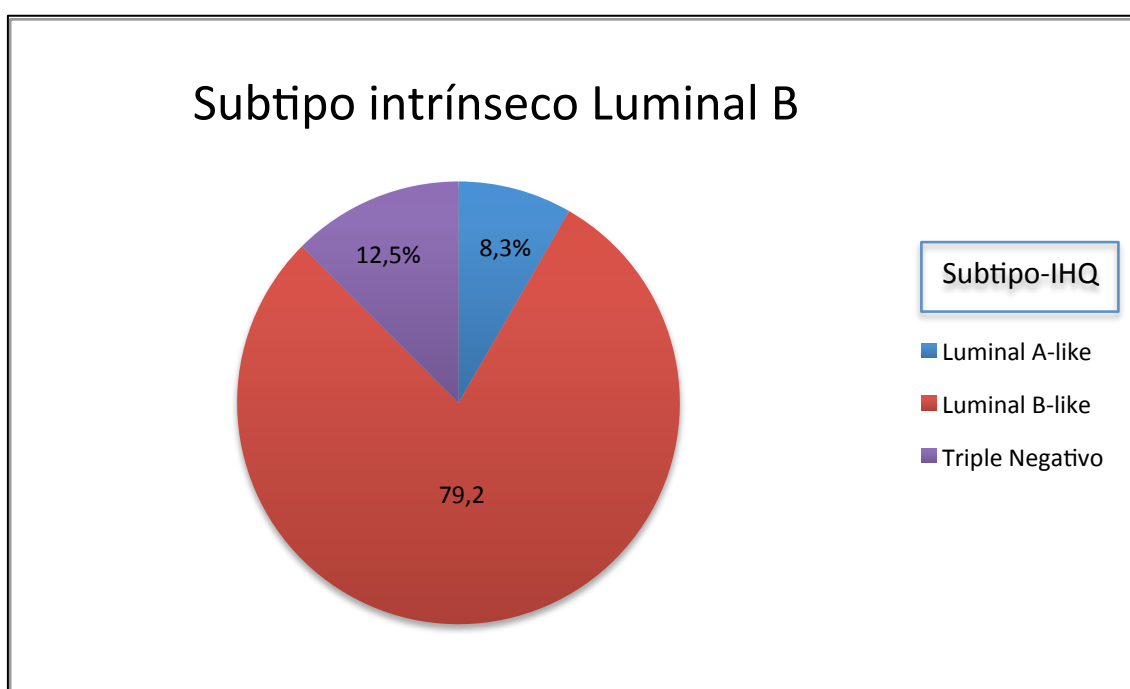


Figura 27. Concordancia entre el subtipo-IHQ definido en la biopsia por trucut y el subtipo intrínseco en las pacientes con tumores Luminal B en nuestra serie (PAM50).

De los tumores HER2-enriched el 42,9% fue HER2 mediante IHQ, el 42,9% Luminal-like (ninguno clasificado como Luminal A) y el 14,2% Triple Negativo (Figura 28). De igual forma, los resultados son similares a los de Prat con un 51% de tumores HER2-enriched definidos como HER2, un 31% clasificado como subtipo Luminal-like y un 18% como Triple Negativo.

Los tumores Basal-like en nuestro estudio fueron el 78,9% Triple Negativo y el 21,1% Luminal-like. En el estudio de Prat un 83% fueron clasificados como Triple Negativo, un 8% como HER2 y solo un 9% como Luminal-like. En este caso, ningún tumor Basal-like de nuestra serie fue clasificado como HER2 mediante IHQ y se observó un porcentaje superior clasificado como tumores luminales (Figura 29).

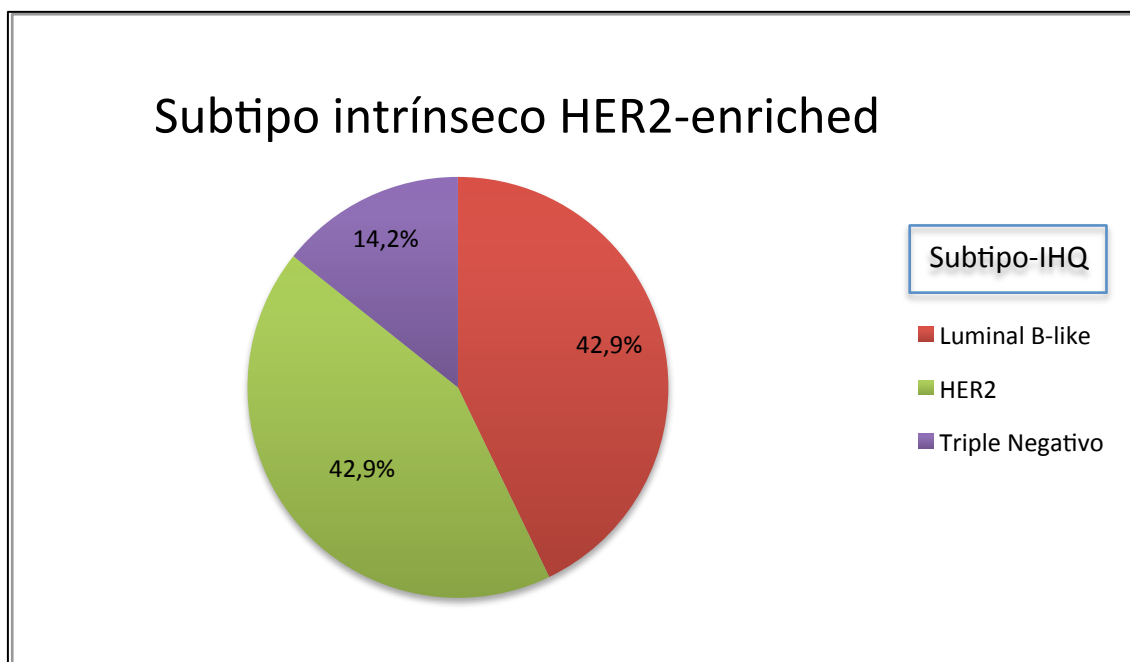


Figura 28. Concordancia entre el subtipo-IHQ definido en la biopsia por trucut y el subtipo intrínseco en las pacientes con tumores HER2-enriched en nuestra serie (PAM50).

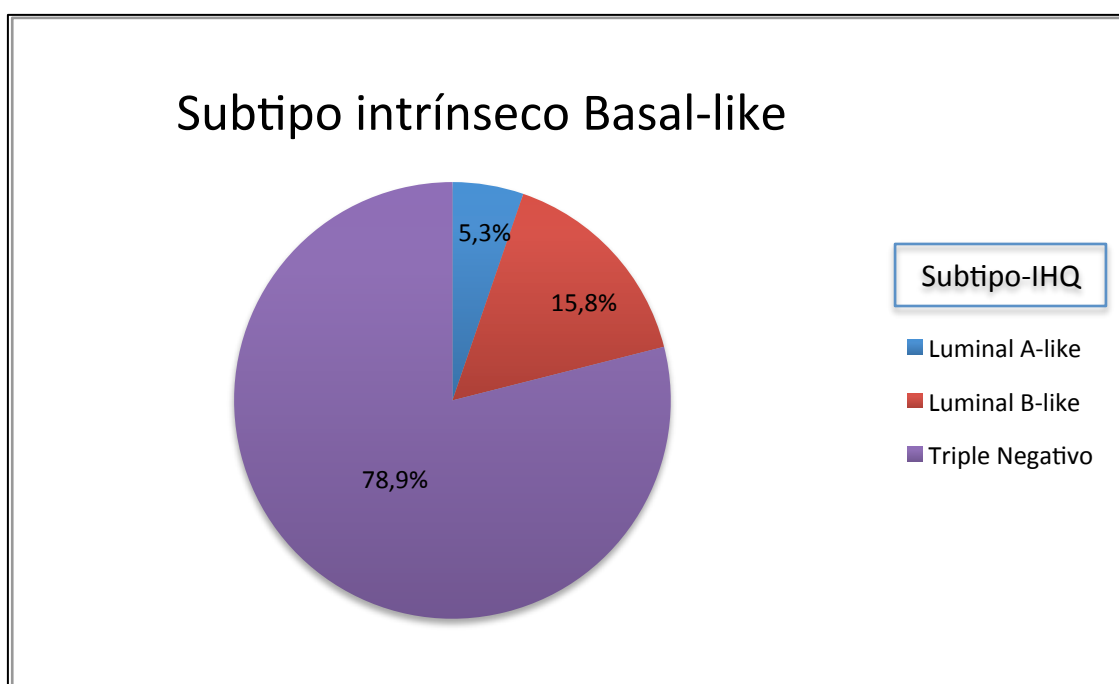


Figura 29. Concordancia entre el subtipo-IHQ definido en la biopsia por trucut y el subtipo intrínseco en las pacientes con tumores Basal-like en nuestra serie (PAM50).

En un estudio posterior, centrado en la caracterización específica de los tumores Triple Negativo y Basal-like también publicado por Prat et al⁽⁶⁴⁾ en 2013, se analizan los resultados de una serie de pacientes con tumores Triple Negativo (412) y Basal-like (473), empleando de nuevo PAM50 para la clasificación en subtipos intrínsecos. El 78,6% de los tumores Triple Negativo fue clasificado mediante estudio genómico como Basal-like y el 68,5 % de los tumores Basal-like presentó subtipo Triple Negativo (Figura 30).

En nuestra serie, los tumores definidos por IHQ como Triple negativo fueron en el 60% de los casos tumores Basal-like, en el 8% Luminal A, en el 12% Luminal B, en el 8%

HER2-enriched y en el 12% Normal-like, presentando una menor concordancia que en los datos publicados por Prat et al^(64, 67).

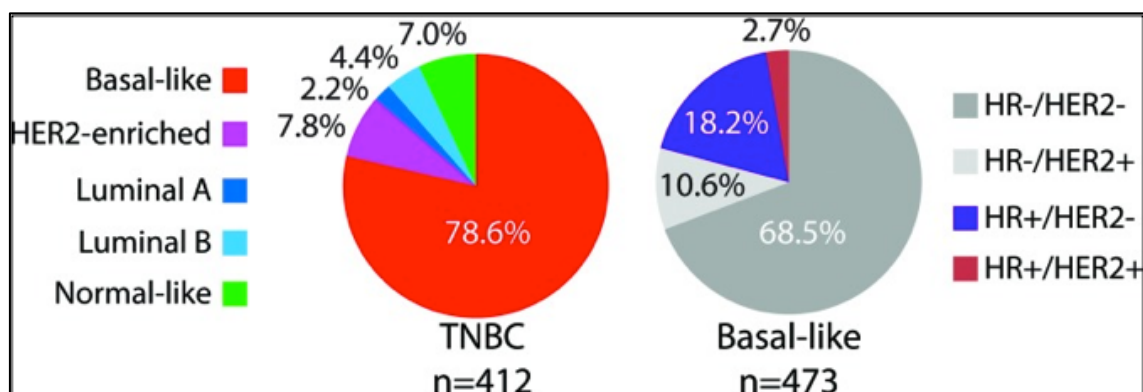


Figura 30. Concordancia entre el subtipo intrínseco y el subtipo-IHQ en los tumores definidos como Triple Negativo (IHQ) y Basal-like (PAM50). Fuente: Prat A et al. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist*. 2013;18(2):123-33.

Para analizar la importancia de este hallazgo hemos usado a continuación la comparación del subtipo-IHQ con la determinación gold standard (PAM50) en nuestra serie. Dentro de los tumores Basal-like (PAM50) un 78,9% son Triple negativo y pocas pacientes con tumores Basal-like fueron definidas dentro de otros subgrupos-IHQ, clasificándose el resto como tumores Luminal A (5,3%) y Luminal B-like (15,8%), siendo en este caso mayor el grado de concordancia que la serie publicada por Prat (Figura 30).

En el estudio de Prat se observó que los tumores Triple Negativo no clasificados como Basal-like presentaban un perfil de expresión génica similar al subtipo intrínseco en el que se clasifican mediante PAM50. Lo mismo sucedía con los tumores HER2-enriched. Los tumores HER2-enriched que no presentaban amplificación o sobreexpresión de

HER2 presentaban un perfil genómico indistinguible de los tumores HER2-enriched con sobreexpresión o amplificación de HER2. Estos hallazgos hacen pensar que los parámetros de IHQ que empleamos actualmente no son suficiente para aproximarnos a la verdadera biología tumoral en el cáncer de mama.

Estos datos concuerdan con los publicados en 2013 y actualizados en 2015 en el estudio de Cheang et al⁽¹⁷²⁾. En este estudio se analizan 1557 casos que provienen de 3 estudios randomizados (Tabla 24). El análisis IHQ se realiza de manera centralizada y el estudio genómico mediante el empleo de PAM50. Al emplear como umbral de positividad de RH el 1% de células con expresión de RE o RP, los tumores definidos mediante PAM50 como Luminal A son en un 98,2% tumores Luminal-like (RH+/HER2+ o -), los Luminal B en un 94,5% son tumores Luminal-like y los Basal-like son en un 90,8% definidos como Triple negativo, concordancia superior a la descrita en nuestra serie. Los tumores HER2-enriched, sin embargo, son en un bajo porcentaje tumores HER2+ (25,7%), menor al de nuestra serie (42,9%).

Subtype	ER/PR- (<1%)		ER/PR borderline (1%-9%)		ER/PR+ (≥10%)	
	HER2- (n = 283)	HER2+ (n = 106)	HER2- (n = 39)	HER2+ (n = 26)	HER2- (n = 976)	HER2+ (n = 127)
Basal-like	207 (73.1)	6 (5.7)	7 (17.9)	0	8 (0.8)	0
HER2-E	48 (17)	87 (82.1)	12 (30.8)	20 (76.9)	102 (10.5)	69 (54.3)
Luminal A	6 (2.1)	3 (2.8)	7 (17.9)	1 (3.8)	477 (48.9)	16 (12.6)
Luminal B	15 (5.3)	8 (7.5)	10 (25.6)	3 (11.5)	346 (35.5)	39 (30.7)
Normal-like	7 (2.5)	2 (1.9)	3 (7.7)	2 (7.7)	43 (4.4)	3 (2.4)

Tabla 24. Definición de los subtipos tumorales mediante técnicas de IHQ y su concordancia con el subtipo intrínseco en función de los valores de expresión de RE y RP. Fuente: Cheang MC et al. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *Oncologist*. 2015;20(5):474-82.

Esta concordancia entre el subtipo genómico y el definido mediante IHQ disminuye al cambiar el umbral de positividad de RE o RP por lo que, al igual que en nuestra serie, emplear como umbral de positividad de RH el 1% permite definir de manera más precisa el verdadero subtipo tumoral intrínseco de estos tumores.

En 2015, Prat et al⁽⁷⁰⁾ publican una revisión de los datos de distintas series publicadas que estudian la concordancia del subtipo intrínseco y el subtipo-IHQ. Este estudio pretende evaluar la validez de los criterios de St.Gallen de 2013, al definir el subtipo subrogado mediante el empleo de IHQ (RE, RP, ki67, HER2, a la hora de aproximarse al el subtipo intrínseco. Con los datos agrupados en esta revisión de más 5000 de pacientes, los tumores definidos como Luminal A-like, Luminal B-like, HER2 y Triple Negativo son en un 62,2%, 51,1%, 66,1% y 86,1% tumores Luminal A, Luminal B, HER2-enriched y Basal-like definidos mediante PAM50, respectivamente. Estos datos son superponibles a los de nuestro estudio donde también empleamos los criterios de St.Gallen 2013 para definir los subtipos subrogados, siendo estos porcentajes del 68%, 55%, 52,6% y 85,3% para los tumores Luminal A, Luminal B, HER2-enriched y Basal-like, respectivamente.

Ante los resultados expuestos podemos concluir que no es correcto emplear indistintamente las clasificaciones en subtipos intrínsecos y la clasificación definida mediante IHQ como si fueran sinónimos ya que hay un porcentaje de discordancias clínicamente significativo, cuya repercusión sobre el pronóstico o incluso el enfoque terapéutico puede ser de gran relevancia.

5.6. VALIDEZ , SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA IHQ COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA DEL SUBTIPO INTRÍNSECO. ¿QUÉ IMPLICA EMPLEAR LAS DOS DETERMINACIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS?

En nuestro estudio, hemos combinado las dos determinaciones de RE, RP, HER2 (pre y post-tratamiento) mediante la creación del subtipo-IHQ compuesto. En la práctica clínica, interpretar como válido el valor más relevante clínicamente de las determinaciones de dichos marcadores en la biopsia o la pieza quirúrgica influye en:

-VALIDEZ: El empleo de ambas determinaciones mejora la validez de la IHQ en los tumores Luminal A y B ya que mejora la especificidad en los tumores Luminal A en un 27% y la sensibilidad en los Luminal B respecto a su determinación en la pieza quirúrgica en un 45,5%. Sin embargo, para identificar los tumores HER2-enriched la determinación IHQ sobre la biopsia es la que presenta mayor validez diagnóstica y en este caso el subtipo-IHQ compuesto no aporta beneficios. En el caso de los tumores Basal-like tampoco parece aportar beneficios. El empleo de ambas determinaciones IHQ disminuye la tasa de falsos positivos (aumenta la especificidad) pero a cambio de aumentar la tasa de falsos negativos (disminuye la sensibilidad), detectando peor los tumores Basal-like.

- SEGURIDAD: La IHQ presenta un alto valor predictivo positivo para definir el verdadero subtipo intrínseco cuando se realiza sobre la biopsia en los tumores Luminal A y HER2-enriched y es muy bajo en todos los subtipos cuando se realiza sobre la pieza quirúrgica, salvo en los HER2-enriched que es del 100%. Este valor de la IHQ sobre la

pieza quirúrgica aumenta al emplear las dos determinaciones IHQ en un 48,2%, 12,5% y un 1,4% en los Luminal A, Luminal B, Basal-like, respectivamente. Por otro lado, el valor predictivo negativo mejora cuando se emplean ambas determinaciones en un 7,1% y un 20,3% en los tumores Luminal A y Luminal B sin generar importantes variaciones en el resto de los subtipos.

- EFICACIA: En este caso el empleo de ambas determinaciones IHQ mejora la eficacia de la IHQ para definir los subtipos Luminal A y Luminal B, manteniendo similar eficacia en los tumores Basal-like. En los HER2-enriched, sin embargo, la eficacia de la IHQ es máxima cuando se aplica sobre la biopsia.

En resumen, el empleo conjunto de ambas determinaciones IHQ y la interpretación de la de mayor valor como válida permite mejorar la validez, seguridad y eficacia de la IHQ como prueba para diagnosticar los subtipos intrínsecos Luminal A y Luminal B de cáncer de mama. No aporta beneficios significativos en el caso de los tumores Basal-like ni HER2-enriched.

5.7. RESPUESTA TUMORAL AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE: DIFERENCIAS ENTRE LOS SUBTIPOS INTRÍNSECOS Y LOS SUBTIPOS DEFINIDOS MEDIANTE TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

El estatus de RE, RP, ki67, HER2 y grado tumoral son conocidos factores predictivos de respuesta al tratamiento con QT. Estudios recientes avalan que el subtipo tumoral puede actuar también como factor predictor de respuesta.

Inicialmente los estudios se centraron en relacionar la respuesta tumoral con los parámetros IHQ (Subtipo-IHQ). En este sentido, Carey et al⁽⁵⁹⁾ publicaron en 2007 un estudio de 107 pacientes donde tras 4 ciclos de adriamicina-ciclofosfamida el 7% de los tumores Luminal-like, 36% de los HER2 y el 27% de los casos Triple Negativo presentan pCR. En nuestra serie la tasa de pCR fue algo menor. Se observó mayor pCR en los tumores HER2 y Triple negativo, siendo del 13,6% y 17,1%, respectivamente. En los casos Luminal A-like y Luminal B-like la tasa de pCR fue del 10,7% y 9,1%, respectivamente.

Respecto al subtipo intrínseco, los porcentajes de pCR en nuestra serie fueron 10%, 8,3%, 21,4% y 21,1% para los casos Luminal A, Luminal B, HER2-enriched y Basal-like, respectivamente, definiéndose dos subgrupos con mayor sensibilidad a la QT: HER2-enriched y Basal-like.

Este dato coincide con lo publicado en estudios recientes. En el estudio de Rouzier et al⁽⁶⁰⁾, 82 pacientes con cáncer de mama localmente avanzado que disponían de estudio genómico (subtipo intrínseco) fueron tratadas con QT basada en paclitaxel seguido de tratamiento con el esquema FAC (5-fluorouracilo, adriamicina, ciclofosfamida) completando en total 6 meses de tratamiento con QT neoadyuvante. La tasa de pCR en función del subtipo intrínseco fue del 7% en los tumores con subtipo Luminal A/B, 45% en los HER2-enriched y 45% en los tumores Basal-like, siendo significativamente superior en los subtipos HER2-enriched y Basal-like ($p < 0,01$).

En el estudio de Parker et al 2009⁽³⁵⁾ se analiza la respuesta tumoral de 357 pacientes incluidas en 3 ensayos clínicos. El tratamiento de QT, en función del ensayo clínico en el que estuvieran incluidas las pacientes, consistía en: adriamicina-ciclofosfamida seguido de docetaxel o paclitaxel, o paclitaxel seguido de FAC. El tratamiento neoadyuvante en todos los casos contenía antraciclinas y taxanos y el tiempo de duración fue de 6 meses. La tasa de pCR fue del 7%, 17%, 36% y 43% en los tumores con subtipo intrínseco Luminal A , Luminal B ,HER2-enriched y Basal-like, respectivamente, datos muy similares a los del estudio de Rouzier et al.

Por lo tanto, tras los resultados de estos estudios, el subtipo intrínseco es considerado un factor predictivo de respuesta al tratamiento, siendo los subtipos intrínsecos Basal-like y HER2-enriched los que mayor sensibilidad presentan a QT y comportándose como dos factores independientes de respuesta al tratamiento, dato que se observa también en nuestros resultados.

En el estudio NOAH se ha evaluado el papel de los subtipos intrínsecos como factor predictivo de tratamientos diana⁽¹⁷³⁾. En este estudio , en el que se evaluó el beneficio de QT y de trastuzumab en tumores con o sin sobreexpresión de HER2 , se observa de nuevo que los tumores con mayor respuesta a la QT son los tumores Basal-like y HER2-enriched, teniendo en cuenta que la adición de trastuzumab a la terapia con citotóxicos aumenta la tasa de respuesta en los tumores con sobreexpresión de HER2 (independientemente del subtipo intrínseco). Aunque se observó mayor tasa de respuestas en las pacientes HER2 tratadas con trastuzumab-QT con subtipo intrínseco

HER2-enriched (TR: 52,9 vs 34,5%, $p=0,10$), esta diferencia no fue significativa (Tabla 25).

Subtype	HER2 ⁻ disease					HER2 ⁺ disease									
	Arm 1 (w/o T)					Arm2 (w/o T)					ARM3 (with T)				
	pCR	%	RD	%	<i>P^b</i>	pCR	%	RD	%	<i>P^b</i>	pCR	%	RD	%	<i>P^b</i>
Luminal A	0	0.0	13	100.0	0.020	0	0.0	5	100.0	0.50	2	28.6	5	71.4	0.320
Luminal B	2	28.5	5	71.4		3	42.9	4	57.1		2	50.0	2	50.0	
HER2-E	2	50.0	2	50.0		8	27.6	21	72.4		18	52.9	16	47.1	
Basal-like	4	36.4	7	63.6		0	0.0	3	100.0		3	60.0	2	40.0	
Normal-like	0	0.0	7	100.0		1	14.3	6	85.7		3	23.1	10	76.9	

Tabla 25. Tasas de pCR en una serie de tumores HER2+ y HER2- tratados con QT neoadyuvante. Arm 1: Tumores HER2- tratados solamente con QT. Arm 2: Tumores HER2+ tratados solamente con QT. Arm 3: Tumores HER2+ tratados con QT + trastuzumab. Fuente : Prat A et al. Research-based PAM50 subtype predictor identifies higher responses and improved survival outcomes in HER2-positive breast cancer in the NOAH study. Clin Cancer Res. 2014;20(2):511-21.

En nuestra serie hemos observado, al igual que en las series publicadas de similares características, una mayor respuesta (Clasificaciones de Symmans y Miller & Payne) y mayor tasa de pCR de los tumores HER2 y Triple negativo (subtipo IHQ) y HER2-enriched y Basal-like (subtipo intrínseco) aunque esta diferencia no llega a ser estadísticamente significativa respecto a los casos luminales. Una explicación de que la tasa de respuesta de dichos subtipos en nuestra serie sea menor respecto a las otras series puede estar en relación con un menor tiempo de tratamiento (3 meses versus 6 meses) o el empleo de monoterapia (adriamicina o docetaxel) frente a los esquemas de poliquimioterapia de los estudios mencionados.

Por último, en nuestra serie evaluamos si existía algún subtipo tumoral definido mediante IHQ que presentase mayor respuesta a la terapia con adriamicina o con docetaxel y observamos que no hay diferencias significativas de pCR entre los distintos subtipos según hayan recibido una u otra terapia, aunque se observaron mayores tasas de pCR con docetaxel de los tumores Triple Negativo (21% vs 12%) y con adriamicina de los tumores HER2 (17% vs 10%). Al evaluar la pCR en los subtipos intrínsecos observamos que aunque las diferencias tampoco son significativas los tumores Basal-like y HER2-enriched presentaron mayor tasa de pCR con docetaxel (33,3% vs 10% y 50% vs 12%, respectivamente).

Cuando evaluamos la respuesta en función del valor de RCB, los tumores Triple Negativo presentaron una mayor respuesta al tratamiento con docetaxel respecto a la adriamicina cercana a la significación estadística ($p=0,097$) y los tumores Basal-like o HER2-enriched también presentaron mayores tasas de respuesta con docetaxel cercanos a la significación estadística en ambos casos ($p=0,176$ y $p=0,065$, respectivamente).

Este resultado apoya la idea que hemos esbozado anteriormente de que aunque la definición de los subtipos-IHQ nos aproxima a la biología del tumor y nos permite comprender mejor su comportamiento, el subtipo-IHQ no debe emplearse como sinónimo del subtipo intrínseco. Probablemente en el futuro el estudio genómico tumoral se convierta en una herramienta que ayude a definir mejor qué pacientes se benefician de determinados tratamientos con el fin de individualizar la terapia en cada paciente.

6. CONCLUSIONES.....

La QT neoadyuvante induce un cambio en el estatus de los RE, RP, ki67 y HER2 ya que los cambios detectados son superiores a lo esperado por alteración de la técnica, heterogeneidad tumoral o la variabilidad inter o intra-observador.

La QT neoadyuvante induce un cambio de estatus de RE del 12% y RP del 22,2%, siendo este cambio en la mayoría de los casos de positivo (en la biopsia) a negativo (en la pieza quirúrgica).

La QT neoadyuvante produce un descenso significativo de los valores de expresión de los RP y ki67 medidos mediante IHQ y se asocia además a la pérdida de sobreexpresión/amplificación de HER2 .

Los cambios IHQ en los RE, RP y HER2 pueden suponer un cambio de decisión terapéutica en casi el 30% de las pacientes por lo que se recomienda realizar determinación de dichos receptores en la biopsia y la pieza quirúrgica.

El estudio IHQ en la biopsia diagnóstica concuerda con el estudio genómico en mayor grado que el estudio IHQ en la pieza quirúrgica.

A la hora de decidir la terapia de las pacientes que presentan cambios en la IHQ, interpretar como válidas las determinaciones con mayor nivel de expresión de la biopsia o en la pieza quirúrgica nos permite mejorar la capacidad diagnóstica de los subtipos intrínsecos, mediante el empleo de los subtipos subrogados basados en los resultados de IHQ, en los tumores Luminal A y Luminal B ya que mejora su validez, su

seguridad y su eficacia. Los tumores HER2-enriched y Basal-like no se benefician del empleo de ambas determinaciones IHQ.

Los subtipos-IHQ y los subtipos intrínsecos definidos mediante las plataformas genómicas no deben ser empleados como sinónimos ya que existe un elevado porcentaje de discordancias.

El subtipo intrínseco y el subtipo subrogado definido mediante IHQ son factores predictivos de respuesta al tratamiento, siendo los tumores HER2/HER2-enriched y Triple Negativos/Basal-like los que presentan mayores tasas de respuesta tumoral al tratamiento con QT neoadyuvante.

7. RESUMEN.....

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama constituye un importante problema de salud. Aunque su incidencia está aumentando, la supervivencia ha mejorado gracias al avance en los métodos diagnósticos y los tratamientos. En el cáncer de mama localmente avanzado la supervivencia a 5 años es mayor al 80% y el tratamiento se basa en QT neoadyuvante con combinaciones de antraciclinas y taxanos, terapia anti-HER2 (tumores con sobreexpresión/amplificación de HER2), terapia hormonal (tumores hormono-sensibles) y RT adyuvante en pacientes de alto riesgo de recaída local.

Actualmente las decisiones terapéuticas se basan en los resultados de la determinación de RE, RP, ki67 y HER2, marcadores estudiados en la biopsia inicial mediante técnicas de IHQ y/o FISH (HER2). Tras el tratamiento con QT se producen variaciones en estos cuatro marcadores en la pieza quirúrgica. La determinación de estos marcadores mediante técnicas de IHQ y/o FISH debe seguir un protocolo riguroso para minimizar las variaciones dependiente de la técnica.

En los últimos años, han sido varios los estudios publicados en los que a través del estudio de 50 genes (PAM50) se han definido 4 subtipos intrínsecos de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, HER2-enriched y Basal-like. Un último subtipo denominado Claudin-low ha sido descrito recientemente. Los subtipos intrínsecos son factores predictivos de respuesta a la QT y tienen valor pronóstico. El grupo de expertos de St.Gallen en 2013, de acuerdo con los datos publicados en la literatura, ha establecido unos criterios para definir los subtipos subrogados de los subtipos

intrínsecos en base a los hallazgos de IHQ en los RE, RP, ki67 y HER2. Los subtipos-IHQ subrogados son: Luminal A-like, Luminal B-like, HER2, Triple Negativo.

2. HIPOTÉISIS Y OBJETIVOS

El objetivo principal de nuestro estudio es conocer el grado de variabilidad en las determinaciones de los RE, RP, ki67 y HER2 tras la QT neoadyuvante, las causas de esta variación y su repercusión en la decisión terapéutica y el pronóstico de estas enfermas.

Otros objetivos del estudio son:

- Valorar la concordancia entre el subtipo intrínseco definido mediante el empleo de PAM50 y el subtipo subrogado definido mediante los resultados de IHQ en la biopsia por trucut y el espécimen quirúrgico.
- Conocer la distribución por subtipos-IHQ en las dos muestras (biopsia y espécimen quirúrgico) y los porcentajes de cambio de subtipo, analizando las causas del cambio.
- Valorar la utilidad del empleo de las dos determinaciones IHQ para la toma de decisiones. Para ello generamos un subtipo-IHQ al que denominaremos “subtipo-IHQ compuesto” basado en el mayor de los dos valores de expresión de RE, RP, ki67 y HER2 para valorar la concordancia de este subtipo con el subtipo intrínseco y su utilidad en la práctica clínica.
- Estudiar la validez, seguridad y eficacia de la IHQ como prueba diagnóstica, tras compararla con el gold standard (PAM50), para definir los subtipos intrínsecos.
- Valorar si los subtipos-IHQ e intrínsecos son predictores de respuesta al tratamiento en nuestra serie.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron 179 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama localmente avanzado, inoperable o estadio II no subsidiario de cirugía conservadora, con determinación de RE, RP, HER2 y ki67 mediante técnicas de IHQ y/o FISH (HER2) tanto en la biopsia inicial como en la pieza quirúrgica, que participaron en un ensayo clínico Fase II.

El ensayo clínico se desarrolló en el Hospital Clínico San Carlos (NCT 00123929) en Madrid, España. Criterios de inclusión: edad entre 18-75 años. No se incluyeron pacientes con FEVI<50% ni hiperbilirrubinemia.

Entre Junio de 2005 y Mayo de 2009, las pacientes fueron randomizadas a recibir tratamiento de QT neoadyuvante con adriamicina o docetaxel (4 ciclos). Posteriormente las pacientes fueron intervenidas en el Hospital Clínico San Carlos. La biopsia fue estudiada en el Hospital Clínico San Carlos y la pieza quirúrgica en el Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca. La determinación de RE, RP, ki67 y HER2 se realizó según el protocolo estándar de cada centro. Se consideró RE y RP positivo si al menos el 1 % de las células presentaban inmunotinción para el RH. Se definió Ki67 “alto” y RP “alto” si al menos el 20% de las células presentaba inmunotinción para ki67 y RP, respectivamente. HER2 3+ (IHQ) o ERBB2/CEP17 \geq 2,2 (FISH) se consideraron HER2 positivo .

Tras la cirugía las pacientes HER2 positivo completaron tratamiento con trastuzumab y las pacientes hormono-sensibles recibieron hormonoterapia. La respuesta tumoral se

evaluó en todas las pacientes mediante las clasificaciones de Symmans y Miller & Payne. Se realizó estudio genómico mediante PAM50 en 91 pacientes.

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS17 y epidat 4.1.

4. RESULTADOS

El 61,5% de las pacientes presentó positividad para los RE, un 54,2% para los RP, un 28,5% para HER2 y un 69,3% presentó niveles altos de ki67. En la biopsia el 16% fueron tumores Luminal A-like, 49% Luminal B- like, 12% HER2, 23% Triple Negativo. De las 91 pacientes que disponen de estudio genómico (PAM50), la distribución de los subtipos intrínsecos fue la siguiente: Luminal A (22%), Luminal B (26%), HER2-enriched (16%) y Basal-like (21%).

El 12%, 22,2%, 14% y 44, 3% de las pacientes presentó cambio de estatus del RE, RP, HER2 y ki67, respectivamente. El cambio fue de positivo a negativo en el 68,4%, 60% y el 63,6% de los casos que presentaron cambio de estatus de RE, RP y HER2 y de alto a bajo nivel de expresión de ki67 en el 90% de los casos que presentó cambio de ki67. Este descenso de ki67 fue significativamente mayor en los tumores Luminal B-like, $p<0,001$. En la pieza quirúrgica se observa un descenso en los valores absolutos de expresión de RP y ki67 estadísticamente significativo, $p<0,05$.

Se produce cambio de subtipo-IHQ tras la QT neoadyuvante en el 36,7% de las pacientes. El cambio de subtipo-IHQ tumoral más frecuente fue del subtipo Luminal B-like a Luminal A-like como consecuencia del descenso de ki67 en el 52% de los casos.

El subtipo-IHQ determinado en la pieza quirúrgica presenta menor concordancia ($K=0,22$) con el subtipo intrínseco que el subtipo definido mediante IHQ en la biopsia ($K=0,499$).

La creación del subtipo-IHQ compuesto nos ha permitido conocer la utilidad de emplear el mayor valor de ambas determinaciones IHQ a la hora de tomar decisiones terapéuticas. La IHQ es más eficaz para definir el subtipo intrínseco cuando se emplea sobre la biopsia, es mayor en los tumores Basal-like y aumenta su eficacia cuando se emplean ambas determinaciones en los tumores Luminal A y B.

Los tumores HER2/HER2-enriched y Triple Negativo/Basal-like presentan mayor tasa de pCR a QT, $p>0,05$. La respuesta tumoral (RCB) es mayor con docetaxel en los tumores Triple Negativo ($p=0,097$), HER2-enriched ($p=0,065$) y Basal-like ($p=0,176$). Los tumores Luminal B presentan sensibilidad intermedia y los Luminal A presentan mayor porcentaje de tumores resistentes al tratamiento.

6. CONCLUSIONES

La QT induce un cambio en el estatus de RE, RP, ki67 y HER2 superior a lo esperado por alteraciones de la técnica, variabilidad del observador o heterogeneidad intratumoral, en probable relación con el efecto del tratamiento. Los cambios más frecuentes tras el tratamiento de QT son aquellos en los que se produce un descenso en los niveles de RE, RP, ki67 o HER2. Este cambio es clínicamente significativo ya que supone un cambio en la decisión terapéutica en casi un tercio de las pacientes. En el

caso de RP y ki67 este descenso es también estadísticamente significativo. El empleo de las dos determinaciones de IHQ aumenta la validez, seguridad y eficacia de la IHQ como test diagnóstico del subtipo intrínseco. Los subtipos subrogados definidos mediante IHQ no son sinónimos de los subtipos intrínsecos ya que existe solamente un moderado grado de concordancia entre ellos. El subtipo intrínseco es un factor predictivo de respuesta al tratamiento.

8. SUMMARY.....

1. INTRODUCTION

Breast cancer is an important and persistent health issue; although patient survival has improved thanks to advances in diagnostic methods and treatments, its incidence is increasing.

The overall five-year survival rate of locally advanced breast cancer is greater than 80%; treatments used on these tumors are neoadjuvant chemotherapy (with combinations of anthracyclines and taxanes), anti-HER2 therapy (HER2+ tumors), surgery, adjuvant hormonal therapy (hormone-sensitive tumors), and radiotherapy.

Current breast cancer therapy decisions are based on the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), ki67, and HER2 findings as determined by immunohistochemistry (IHC) and/or the in situ hybridization technique (HER2) in initial biopsies. Surgical specimens obtained post-chemotherapy often demonstrate variations in these four markers. The determination of markers by IHC must meet a rigorous protocol in order to minimize variations depending on the technique.

In recent years, some studies that have analyzed 50 tumor genes (PAM50) have divided breast cancer into four major intrinsic subtypes: Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, and Basal-like. A final subtype called Claudin-low has also recently been defined. Intrinsic subtype is a predictor of response to chemotherapy and has prognostic value.

A group of experts in St. Gallen Consensus 2013, in agreement with recently published medical literature data, have established certain criteria to define surrogate subtypes of intrinsic subtypes based on these IHC findings. The IHC-subtypes are: Luminal A-like, Luminal B-like, HER2 and Triple Negative.

2. HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

The goal of this study is to know the variations in RE, RP, ki67, and HER, results after neoadjuvant chemotherapy, to understand the causes of these variations, and their influence on therapy decisions and breast cancer prognosis.

Other objectives of our study are:

- To evaluate the concordance of intrinsic subtypes (PAM50) with surrogate subtypes (as defined by IHC results) obtained from biopsies and surgical specimens.
- To understand both the distribution of IHC subtypes in biopsies and surgical specimens, as well as the percentage change of these subtypes after chemotherapy, analysing the causes of these changes.
- To evaluate the utility of the two IHC determinations (in the biopsies and surgical specimen) in decision-making. To achieve this aim, an IHC subtype called “compound IHC subtype” is defined by the highest recorded value of ER, PR, ki67 and HER2, analyzing these four markers in both the biopsies and surgical specimens. This compound IHC subtype is compared to the intrinsic subtype to evaluate its clinical utility.

- To study the validity, security, and efficacy of IHC as a diagnostic test, compared to the gold standard technique (PAM50) to define intrinsic subtypes.
- To evaluate whether IHC and intrinsic subtypes are predictors of response to treatment.

3. MATERIAL AND METHODS

179 patients with locally advanced or stage II inoperable breast cancer, with determinations of ER, PR, ki67 and HER2 by IHC and/or FISH (HER2) in their biopsies and surgery specimens, that participated in a phase II clinical trial were included in our study.

The clinical trial was carried out at Hospital Clínico San Carlos (NCT 00123929) in Madrid, Spain. To be included in the study, participants had to be between the ages of 18 and 75. They were diagnosed with either inoperable locally advanced breast cancer or stage II locally advanced breast cancer without alternatives to conservative surgery. Patients with less than 50% of left ventricle ejection fraction or hyperbilirrubinemia were not included. Between June 2005 and May 2009, patients were randomly selected to receive four cycles of either adriamycin or docetaxel neoadjuvant chemotherapy. Following treatment they underwent surgery at Hospital Clínico San Carlos. The biopsies were studied at Hospital Clínico San Carlos, and the surgical specimens at the Center of Cancer Investigation in Salamanca, Spain. The determination of ER, PR, ki67, and HER2 was performed using the standard protocol in each center. The cut off points for ER and PR positivity were established at 1% or more

stained cells. Ki67 “high” and PR “high” were defined as having 20% or more stained cells. HER2 3+ (IHC) or ERBB2/CEP17 $\geq 2,2$ (FISH) were considered HER2 positive.

Patients who were HER2 positive completed treatment with trastuzumab, and hormone-sensitive patients received hormone therapy after surgery. Tumor response was evaluated using Symmans and Miller & Payne classifications in all patients, and the intrinsic subtype using PAM50 in 91 patients.

The statistical analysis was completed with the statistical packet SPSS17 and epidat 4.1.

4. RESULTS

61.5% of the patients were ER+, 54.2% were PR+, 28.5% were HER2+, and 69.3% demonstrated high levels of ki67. In the biopsies, 16% of the patients had Luminal A-like tumors, 49% had Luminal B-like tumors, 12% had HER2 tumors, and 23% had Triple Negative tumors. Intrinsic subtypes distribution was: Luminal A (22%), Luminal B (26%), HER2 (16%), and Basal-like (21%).

12%, 22.2%, 14%, and 44.3% of patients demonstrated changes in RE, RP, HER2 status, and ki67 levels, respectively. The changes were, from positive to negative, in 68.4%, 60% and 63.6% of the cases that showed changes in ER, PR and HER2 status, and from high to low in 90% of the cases that showed changes in ki67 levels, respectively. The decline in Ki67 was higher in Luminal B-like tumors, $p < 0,001$. There was a low,

statistically significant, correlation between the values of PR and ki67 in the biopsies and the surgical specimens, $p < 0,05$. Changes in the four markers were clinically significant, as they are associated with a change in therapeutic decisions in 28.6 % of patients .

A tumor subtype change occurred in 36.7 % of patients. The most frequent change was: Luminal B-like in the biopsy and Luminal A-like in the surgical specimen caused by the decline of ki67 values in 52% of these patients.

There was a lesser degree of concordance of the IHC subtype defined in the surgical specimen with the intrinsic subtype ($K=0,22$) than with the IHC subtype defined in the biopsy ($k=0,499$).

The creation of compound IHC subtype has allowed us to know the value of using the highest value of both IHC determinations when making treatment decisions. IHC was more effective in defining the intrinsic subtype when used on biopsies, in Basal-like tumors, and increased its effectiveness when both determinations were employed in tumors Luminal A and B.

The HER2/HER2-enriched and Triple Negative/Basal-like tumors had a higher rate of pCR, $p > 0.05$. Tumor response (RCB) was greater with docetaxel in Triple Negative tumors ($p = 0.097$), HER2-enriched ($p = 0.065$), and Basal-like ($p=0.176$) tumors. Luminal B tumors had intermediate sensitivity to chemotherapy and Luminal A tumors were more resistant to treatment.

5. CONCLUSIONS

The changes in the 4 markers are greater than the changes caused by the observer variations, tumor heterogeneity, and technique alterations. The changes are probably related to the effect of chemotherapy treatment. The most frequent changes after treatment are those in which there is a decline in the levels of ER, PR, HER2, and Ki67. These changes are clinically significant because they imply a change in therapeutic decisions in about a third of patients. The decrease of the values of Ki67 and PR is statistically significant. The use of the two determinations of IHC increases the validity, safety, and efficacy of IHC as a diagnostic test of the intrinsic subtype. The surrogate subtypes defined by IHC are not synonymous with the intrinsic subtypes, as their degree of agreement is only moderate. Intrinsic subtypes predict response to treatment.

9. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....

1. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación histológica del cáncer de mama.....	13
Tabla 2. Cuantificación de los receptores hormonales y HER2.....	13
Tabla 3 . Grado histológico combinado de Nottingham.....	14
Tabla 4. Sistema de estadiaje TNM abreviado. 7ª Edición.....	21
Tabla 5. Estadios en cáncer de mama. Sistema TNM. 7ª Edición.....	22
Tabla 6. Distribución de los subtipos moleculares de cáncer de mama en distintas series publicadas.....	41
Tabla 7. Concordancia entre el subtipo intrínseco (PAM50) y el subtipo definido mediante IHQ de acuerdo con el Consenso de St.Gallen 2013.....	45
Tabla 8. Porcentaje de buena respuesta patológica (RCB 0 y I) y RCB media en función del subtipo intrínseco y tipo de QT administrada (adriamicina/docetaxel).....	64
Tabla 9. Características clínicas y anatomopatológicas de las pacientes incluidas en el estudio.....	79
Tabla 10. Características inmunohistoquímicas de las muestras obtenidas mediante biopsia por trucut.....	80
Tabla 11. Porcentajes de expresión de RE, RP, HER2 y ki67 en función del subtipo intrínseco definido mediante PAM50.....	85
Tabla 12. Cambios cualitativos en la expresión RE, RP, HER2, ki67 entre la pieza quirúrgica y la biopsia por trucut tras el tratamiento neoadyuvante.....	87
Tabla 13. Variabilidad cuantitativa de los porcentajes de expresión de RE, RP y Ki67 entre la pieza quirúrgica y la biopsia por trucut tras el tratamiento con QT neoadyuvante.....	88

Tabla 14. Porcentajes de cambio de subtipo-IHQ entre la biopsia por trucut y la pieza quirúrgica tras tratamiento con QT neoadyuvante.....	90
Tabla 15. Cambios en la expresión de los RE, RP, HER2 y ki67 en las pacientes que presentan cambio de subtipo Luminal B-like a Luminal A-like.....	91
Tabla 16. Concordancia entre subtipos basados en determinaciones de IHQ (en la biopsia trucut, pieza quirúrgica y subtipo-IHQ compuesto) y subtipo intrínseco definido mediante la plataforma PAM50.....	96
Tabla 17. Validez de la IHQ como prueba diagnóstica de los distintos subtipos tumorales intrínsecos.....	98
Tabla 18. Seguridad en el empleo de técnicas de IHQ (subtipo-IHQ) para la clasificación de los subtipos tumorales intrínsecos.....	100
Tabla 19. Eficacia diagnóstica (Índice de Youden) de los subtipos tumorales definidos mediante IHQ (en la biopsia, pieza quirúrgica o mediante el empleo de ambas determinaciones en el subtipo compuesto) para definir el subtipo intrínseco.....	101
Tabla 20. Respuesta tumoral medida mediante la Clasificación de Symmans en función del subtipo tumoral en la biopsia trucut.....	102
Tabla 21. Respuesta tumoral en base a la Clasificación Miller & Payne en tres categorías: tumores Sensibles (4-5), con Sensibilidad intermedia(2-3) y Resistentes (1-2).....	103
Tabla 22. Valor de RCB (clasificación de Symmans) en función subtipo tumoral en la biopsia trucut.....	104
Tabla 23. Subtipos tumorales definidos mediante IHQ como subrogados de los subtipos intrínsecos definidos mediante estudio genómico (PAM50).....	139

Tabla 24. Definición de los subtipos tumorales mediante técnicas de IHQ y su concordancia con el subtipo intrínseco en función de los valores de expresión de RE y RP.....	147
Tabla 25. Tasas de pCR en una serie de tumores HER2+ y HER2- tratados con QT neoadyuvante.....	153

2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria.....	11
Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer en el mundo.....	15
Figura 3. Incidencia de cáncer de mama en el mundo.....	16
Figura 4. Supervivencia global a los 5 años en base al estadio tumoral al diagnóstico.....	17
Figura 5. Algoritmo diagnóstico para la amplificación de HER2 mediante el empleo de técnicas de HIS con doble sonda.	30
Figura 6. Tecnología nCounter empleada por la plataforma genómica Prosigna® para el estudio de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama.	36
Figura 7. Análisis de agrupamiento jerárquico y perfiles génicos de expresión de los distintos subtipos intrínsecos de cáncer de mama.	39
Figura 8. Curvas Kaplan-Meier de SLE y SG en función del subtipo intrínseco. (Base de datos UNC337 excluyendo Normal Breast-like).....	42
Figura 9. Variables patológicas del tumor primario y ganglionares incluidas la determinación de la respuesta tumoral mediante la clasificación de RCB de Symmans.....	50

Figura 10 .Curvas de Kaplan-Meier de las 4 categorías de respuesta medida mediante la clasificación de RBC.....	51
Figura 11. Clasificación en subtipos tumorales intrínsecos por centroides más cercanos.....	73
Figura 12. Distribución de los subtipos tumorales definidos mediante IHQ en la biopsia por trucut.....	81
Figura 13. Distribución de los subtipos tumorales intrínsecos, definidos mediante estudio genómico PAM50, en la biopsia por trucut.....	82
Figura 14. Distribución de los subtipos-IHQ en la biopsia trucut y concordancia con los subtipos intrínsecos.....	93
Figura 15. Distribución de los subtipos-IHQ en la pieza quirúrgica y concordancia con los subtipos intrínsecos.....	94
Figura 16. Distribución de los subtipos-IHQ compuestos y concordancia con los subtipos intrínsecos.....	94
Figura 17. Respuesta completa patológica en función del subtipo-IHQ de la biopsia trucut.....	105
Figura 18. Respuesta completa patológica en función del subtipo intrínseco de la biopsia trucut.....	106
Figura 19. Respuesta completa patológica en función del subtipo tumoral (IHQ) en la biopsia trucut y tratamiento de QT recibido.....	107
Figura 20. Respuesta completa patológica en función del subtipo tumoral intrínseco de la biopsia trucut y tratamiento de QT recibido.....	107
Figura 21. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad en función del cambio de estatus en los receptores hormonales tras QT neoadyuvante.....	128

Figura 22. Curvas Kaplan-Meier de Supervivencia libre de enfermedad (a) y supervivencia global (b) relacionada con el cambio de estatus de RH.....	129
Figura 23. Representación gráfica de los modelos del cáncer. A: Modelo tradicional o estocástico. B: Modelo jerárquico de las células madre tumorales (CMT).....	136
Figura 24. Subpoblaciones celulares del tejido mamario normal y células potenciales que dan origen de los distintos subtipos intrínsecos de cáncer de mama.....	137
Figura 25. Concordancia entre el subtipo intrínseco y el subtipo definido mediante IHQ en los tumores Luminal A, Luminal B, HER2-enriched y Basal-like (PAM50).....	142
Figura 26. Concordancia entre el subtipo-IHQ definido en la biopsia por trucut y el subtipo intrínseco en las pacientes con tumores Luminal A (PAM50).....	143
Figura 27. Concordancia entre el subtipo-IHQ definido en la biopsia por trucut y el subtipo intrínseco en las pacientes con tumores Luminal B (PAM50).....	143
Figura 28. Concordancia entre el subtipo-IHQ definido en la biopsia por trucut y el subtipo intrínseco en las pacientes con tumores HER2-enriched (PAM50).....	144
Figura 29. Concordancia entre el subtipo-IHQ definido en la biopsia por trucut y el subtipo intrínseco en las pacientes con tumores Basal-like (PAM50).....	145
Figura 30. Concordancia entre el subtipo intrínseco y el subtipo-IHQ en los tumores definidos como Triple Negativo (IHQ) y Basal-like (PAM50).....	146

10. BIBLIOGRAFÍA.....

1. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer,2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>.
2. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013;132(5):1133-45.
3. Lynch BM, Neilson HK, Friedenreich CM. Physical activity and breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res*. 2011;186:13-42.
4. Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet*. 2008;124(1):31-42.
5. Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J, Algara M, et al. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Revista Española de Patología*. 2014;47(1):22-32.
6. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, et al. Breast Cancer Version 2.2015. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015;13(4):448-75.
7. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471-4.
8. Ebctcg, McGale P, Taylor C, Correa C, Cutter D, Duane F, et al. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet*. 2014;383(9935):2127-35.
9. Regan MM, Neven P, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A, Ejlertsen B, Mauriac L, et al. Assessment of letrozole and tamoxifen alone and in sequence for postmenopausal women with steroid hormone receptor-positive breast cancer: the BIG 1-98 randomised clinical trial at 8.1 years median follow-up. *Lancet Oncol*. 2011;12(12):1101-8.
10. Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(12):1135-41.

11. Goss PE, Ingle JN, Pater JL, Martino S, Robert NJ, Muss HB, et al. Late extended adjuvant treatment with letrozole improves outcome in women with early-stage breast cancer who complete 5 years of tamoxifen. *J Clin Oncol*. 2008;26(12):1948-55.
12. Burstein HJ, Prestrud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(23):3784-96.
13. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*. 2013;381(9869):805-16.
14. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1659-72.
15. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(16):3676-85.
16. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, Lluch A, Tjulandin S, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet*. 2010;375(9712):377-84.
17. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2784-95.
18. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(1):118-45.

19. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997-4013.
20. Ignatiadis M, Buyse M, Sotiriou C. St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer: an invaluable tool for physicians and scientists. *Ann Oncol*. 2015;26(8):1519-20.
21. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
22. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(25):1999-2009.
23. Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(17):1183-92.
24. Drukker CA, Bueno-de-Mesquita JM, Retel VP, van Harten WH, van Tinteren H, Wesseling J, et al. A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study. *Int J Cancer*. 2013;133(4):929-36.
25. Knauer M, Mook S, Rutgers EJ, Bender RA, Hauptmann M, van de Vijver MJ, et al. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;120(3):655-61.
26. Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;116(2):295-302.
27. Cardoso F, Van't Veer L, Rutgers E, Loi S, Mook S, Piccart-Gebhart MJ. Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial. *J Clin Oncol*. 2008;26(5):729-35.
28. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2817-26.

29. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(23):3726-34.
30. Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh IT, et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(1):55-65.
31. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 2013;31(22):2783-90.
32. Wolmark N ME, Baehner FL et al. Recurrence score and quantitative ER expression to predict in late distant recurrence risk in ER+ BC after 5 years of tamoxifen. *J Clin Oncol* 2014;2014; 32(5s suppl): abstr 11024.
33. Sgroi DC, Sestak I, Cuzick J, Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder B, et al. Prediction of late distant recurrence in patients with oestrogen-receptor-positive breast cancer: a prospective comparison of the breast-cancer index (BCI) assay, 21-gene recurrence score, and IHC4 in the TransATAC study population. *Lancet Oncol.* 2013;14(11):1067-76.
34. Nielsen T, Wallden B, Schaper C, Ferree S, Liu S, Gao D, et al. Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer.* 2014;14:177.
35. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1160-7.
36. Gnant M, Filipits M, Greil R, Stoeger H, Rudas M, Bago-Horvath Z, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol.* 2014;25(2):339-45.

37. Caan BJ, Sweeney C, Habel LA, Kwan ML, Kroenke CH, Weltzien EK, et al. Intrinsic subtypes from the PAM50 gene expression assay in a population-based breast cancer survivor cohort: prognostication of short- and long-term outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(5):725-34.
38. Sestak I, Cuzick J, Dowsett M, Lopez-Knowles E, Filipits M, Dubsy P, et al. Prediction of late distant recurrence after 5 years of endocrine treatment: a combined analysis of patients from the Austrian breast and colorectal cancer study group 8 and arimidex, tamoxifen alone or in combination randomized trials using the PAM50 risk of recurrence score. *J Clin Oncol.* 2015;33(8):916-22.
39. Gnant M, Sestak I, Filipits M, Dowsett M, Balic M, Lopez-Knowles E, et al. Identifying clinically relevant prognostic subgroups of postmenopausal women with node-positive hormone receptor-positive early-stage breast cancer treated with endocrine therapy: a combined analysis of ABCSG-8 and ATAC using the PAM50 risk of recurrence score and intrinsic subtype. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1685-91.
40. Martin M, Prat A, Rodriguez-Lescure A, Caballero R, Ebbert MT, Munarriz B, et al. PAM50 proliferation score as a predictor of weekly paclitaxel benefit in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;138(2):457-66.
41. Bayraktar S, Royce M, Stork-Sloots L, de Snoo F, Gluck S. Molecular subtyping predicts pathologic tumor response in early-stage breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus capecitabine with or without trastuzumab chemotherapy. *Med Oncol.* 2014;31(10):163.
42. Dubsy P, Filipits M, Jakesz R, Rudas M, Singer CF, Greil R, et al. EndoPredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in ER-positive, HER2-negative early breast cancer. *Ann Oncol.* 2013;24(3):640-7.
43. Muller BM, Keil E, Lehmann A, Winzer KJ, Richter-Ehrenstein C, Prinzler J, et al. The EndoPredict Gene-Expression Assay in Clinical Practice - Performance and Impact on Clinical Decisions. *PLoS One.* 2013;8(6):e68252.
44. Dubsy P, Brase JC, Jakesz R, Rudas M, Singer CF, Greil R, et al. The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. *Br J Cancer.* 2013;109(12):2959-64.
45. Martin M, Brase JC, Calvo L, Krappmann K, Ruiz-Borrego M, Fisch K, et al. Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2-

- breast cancer patients: results from the GEICAM 9906 trial. *Breast Cancer Res.* 2014;16(2):R38.
46. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
 47. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869-74.
 48. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8418-23.
 49. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(18):10393-8.
 50. Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Cervera N, Tarpin C, et al. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65(6):2170-8.
 51. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics.* 2006;7:96.
 52. Calza S, Hall P, Auer G, Bjohle J, Klaar S, Kronenwett U, et al. Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. *Breast Cancer Res.* 2006;8(4):R34.
 53. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R68.
 54. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5367-74.
 55. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2006;19(2):264-71.

56. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 2007;8(5):R76.
57. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(21):5222-32.
58. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1168-76.
59. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007;13(8):2329-34.
60. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11(16):5678-85.
61. Prat A, Ellis MJ, Perou CM. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9(1):48-57.
62. Harrell JC, Prat A, Parker JS, Fan C, He X, Carey L, et al. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(2):523-35.
63. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011;5(1):5-23.
64. Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist.* 2013;18(2):123-33.
65. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):736-50.
66. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St.

Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736-47.

67. Prat A, Cheang MC, Martin M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(2):203-9.

68. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-23.

69. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1533-46.

70. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galvan P, Fernandez A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast.* 2015.

71. Mieog JS, van der Hage JA, van de Velde CJ. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Surg.* 2007;94(10):1189-200.

72. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 1998;16(8):2672-85.

73. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001(30):96-102.

74. Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE, Jr., Mamounas EP, Fisher B, et al. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol.* 2006;24(13):2019-27.

75. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol.* 2008;26(5):778-85.

76. van der Hage JA, van de Velde CJ, Julien JP, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C, Duchateau L. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol*. 2001;19(22):4224-37.
77. Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Porta VG, Semiglazov V, Lluch A, et al. Phase III trial evaluating the addition of paclitaxel to doxorubicin followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil, as adjuvant or primary systemic therapy: European Cooperative Trial in Operable Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(15):2474-81.
78. Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Guillem Porta V, Semiglazov V, Lluch A, et al. Feasibility and tolerability of sequential doxorubicin/paclitaxel followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil and its effects on tumor response as preoperative therapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11(24 Pt 1):8715-21.
79. Evans TR, Yellowlees A, Foster E, Earl H, Cameron DA, Hutcheon AW, et al. Phase III randomized trial of doxorubicin and docetaxel versus doxorubicin and cyclophosphamide as primary medical therapy in women with breast cancer: an anglo-celtic cooperative oncology group study. *J Clin Oncol*. 2005;23(13):2988-95.
80. von Minckwitz G, Raab G, Caputo A, Schutte M, Hilfrich J, Blohmer JU, et al. Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPAR DUO study of the German Breast Group. *J Clin Oncol*. 2005;23(12):2676-85.
81. Untch M, Mobus V, Kuhn W, Muck BR, Thomssen C, Bauerfeind I, et al. Intensive dose-dense compared with conventionally scheduled preoperative chemotherapy for high-risk primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(18):2938-45.
82. Green MC, Buzdar AU, Smith T, Ibrahim NK, Valero V, Rosales MF, et al. Weekly paclitaxel improves pathologic complete remission in operable breast cancer when compared with paclitaxel once every 3 weeks. *J Clin Oncol*. 2005;23(25):5983-92.
83. Smith IC, Heys SD, Hutcheon AW, Miller ID, Payne S, Gilbert FJ, et al. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel. *J Clin Oncol*. 2002;20(6):1456-66.

84. von Minckwitz G, Kummel S, Vogel P, Hanusch C, Eidtmann H, Hilfrich J, et al. Neoadjuvant vinorelbine-capecitabine versus docetaxel-doxorubicin-cyclophosphamide in early nonresponsive breast cancer: phase III randomized GeparTrio trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(8):542-51.
85. Untch M, Rezai M, Loibl S, Fasching PA, Huober J, Tesch H, et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. *J Clin Oncol.* 2010;28(12):2024-31.
86. Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Barni S. Neoadjuvant chemotherapy and concomitant trastuzumab in breast cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *Anticancer Drugs.* 2011;22(2):128-35.
87. Buzdar AU, Suman VJ, Meric-Bernstam F, Leitch AM, Ellis MJ, Boughey JC, et al. Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC-75) followed by paclitaxel plus trastuzumab versus paclitaxel plus trastuzumab followed by FEC-75 plus trastuzumab as neoadjuvant treatment for patients with HER2-positive breast cancer (Z1041): a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(13):1317-25.
88. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(1):25-32.
89. Sikov WM, Dizon DS, Strenger R, Legare RD, Theall KP, Graves TA, et al. Frequent pathologic complete responses in aggressive stages II to III breast cancers with every-4-week carboplatin and weekly paclitaxel with or without trastuzumab: a Brown University Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2009;27(28):4693-700.
90. Esserman LJ, Berry DA, DeMichele A, Carey L, Davis SE, Buxton M, et al. Pathologic complete response predicts recurrence-free survival more effectively by cancer subset: results from the I-SPY 1 TRIAL--CALGB 150007/150012, ACRIN 6657. *J Clin Oncol.* 2012;30(26):3242-9.
91. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, Hasmuller S, Lebeau A, Kreienberg R, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. *J Clin Oncol.* 2011;29(25):3351-7.

92. Isakoff SJ. Triple-negative breast cancer: role of specific chemotherapy agents. *Cancer J*. 2010;16(1):53-61.
93. Carey LA, Winer EP. Defining success in neoadjuvant breast cancer trials. *Lancet*. 2014;384(9938):115-6.
94. Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;124(1):133-40.
95. Sardanelli F, Boetes C, Borisch B, Decker T, Federico M, Gilbert FJ, et al. Magnetic resonance imaging of the breast: recommendations from the EUSOMA working group. *Eur J Cancer*. 2010;46(8):1296-316.
96. Ogston KN, Miller ID, Payne S, Hutcheon AW, Sarkar TK, Smith I, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast*. 2003;12(5):320-7.
97. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007;25(28):4414-22.
98. Martin MR, A Garcia-Asenjo, JL Cheang, M. C Oliva, B. Garcia Saen, J He, X. Caldes, T Diaz-Rubio, E Perou, C.M. Molecular and genomic predictors of response to single-agent doxorubicin (ADR) versus single-agent docetaxel (DOC) in primary breast cancer (PBC). *J Clin Oncol* 2010;28:15s, 2010 (suppl; abstr 502).
99. Romero A, Martin M, Cheang MC, Lopez Garcia-Asenjo JA, Oliva B, He X, et al. Assessment of Topoisomerase II alpha status in breast cancer by quantitative PCR, gene expression microarrays, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol*. 2011;178(4):1453-60.
100. Romero A, Martin M, Oliva B, de la Torre J, Furio V, de la Hoya M, et al. Glutathione S-transferase P1 c.313A > G polymorphism could be useful in the prediction of doxorubicin response in breast cancer patients. *Ann Oncol*. 2012;23(7):1750-6.
101. Kreuzer KA, Lass U, Landt O, Nitsche A, Laser J, Ellerbrok H, et al. Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free

- detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. Clin Chem. 1999;45(2):297-300.
102. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977;33(1):159-74.
103. Altman D MD, Bryant T, Gardner M. Statistics with confidence. 2nd ed. Edition n, editor. Bristol: BMJ Books; May 15, 2000 citado 15 Junio 2015. 254 p.
104. Epidat. Programa para análisis epidemiológico de datos. Versión 4.1. ed. Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, España; Organización Panamericana de la salud (OPS-OMS); Universidad CES, Colombia. . Octubre 2014.
105. Almendro V, Cheng YK, Randles A, Itzkovitz S, Marusyk A, Ametller E, et al. Inference of tumor evolution during chemotherapy by computational modeling and in situ analysis of genetic and phenotypic cellular diversity. Cell Rep. 2014;6(3):514-27.
106. Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B, Redmond C, Vellios F, Sommers SC. The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4). Cancer. 1975;36(1):1-85.
107. Rosen PP. The pathological classification of human mammary carcinoma: past, present and future. Ann Clin Lab Sci. 1979;9(2):144-56.
108. Chuah BY, Putti T, Salto-Tellez M, Charlton A, Iau P, Buhari SA, et al. Serial changes in the expression of breast cancer-related proteins in response to neoadjuvant chemotherapy. Ann Oncol. 2011;22(8):1748-54.
109. Neubauer H, Gall C, Vogel U, Hornung R, Wallwiener D, Solomayer E, et al. Changes in tumour biological markers during primary systemic chemotherapy (PST). Anticancer Res. 2008;28(3B):1797-804.
110. Newsome JF, Avis FP, Hammond JE, Sherwood S. Sampling procedures in estrogen receptor determinations. Ann Surg. 1981;193(5):549-54.
111. Teicher I, Tinker MA, Auguste LJ, Laufer H, Stein TA, Wise L. Effect of operative devascularization on estrogen and progesterone receptor levels in breast cancer specimens. Surgery. 1985;98(4):784-91.
112. Young SC, Burkett RJ, Stewart C. Discrepancy in ER levels of breast carcinoma in biopsy vs mastectomy specimens. J Surg Oncol. 1985;29(1):54-6.

113. Burge CN, Chang HR, Apple SK. Do the histologic features and results of breast cancer biomarker studies differ between core biopsy and surgical excision specimens? *Breast*. 2006;15(2):167-72.
114. Mann GB, Fahey VD, Feleppa F, Buchanan MR. Reliance on hormone receptor assays of surgical specimens may compromise outcome in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(22):5148-54.
115. Connor CS, Tawfik OW, Joyce AJ, Davis MK, Mayo MS, Jewell WR. A comparison of prognostic tumor markers obtained on image-guided breast biopsies and final surgical specimens. *Am J Surg*. 2002;184(4):322-4.
116. Park SY, Kim KS, Lee T-G, Park S-S, Kim SM, Han W, et al. The accuracy of preoperative core biopsy in determining histologic grade, hormone receptors, and human epidermal growth factor receptor 2 status in invasive breast cancer. *The American Journal of Surgery*. 2009;197(2):266-9.
117. Arnedos M, Nerurkar A, Osin P, A'Hern R, Smith IE, Dowsett M. Discordance between core needle biopsy (CNB) and excisional biopsy (EB) for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) and HER2 status in early breast cancer (EBC). *Ann Oncol*. 2009;20(12):1948-52.
118. Zidan A, Christie Brown JS, Peston D, Shousha S. Oestrogen and progesterone receptor assessment in core biopsy specimens of breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 1997;50(1):27-9.
119. Railo M, Nordling S, Krogerus L, Sioris T, von Smitten K. Preoperative assessment of proliferative activity and hormonal receptor status in carcinoma of the breast: a comparison of needle aspiration and needle-core biopsies to the surgical specimen. *Diagn Cytopathol*. 1996;15(3):205-10.
120. Jacobs TW, Siziopikou KP, Prioleau JE, Raza S, Baum JK, Hayes DF, et al. Do prognostic marker studies on core needle biopsy specimens of breast carcinoma accurately reflect the marker status of the tumor? *Mod Pathol*. 1998;11(3):259-64.
121. Fentiman IS, Millis RR, Chaudary MA, King RJ, Miller KJ, Hayward JL. Effect of the method of biopsy on the prognosis of and reliability of receptor assays in patients with operable breast cancer. *Br J Surg*. 1986;73(8):610-2.

122. Douglas-Jones AG, Collett N, Morgan JM, Jasani B. Comparison of core oestrogen receptor (ER) assay with excised tumour: intratumoral distribution of ER in breast carcinoma. *J Clin Pathol.* 2001;54(12):951-5.
123. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(7):1016-9.
124. De Marzo AM, Fedor HH, Gage WR, Rubin MA. Inadequate formalin fixation decreases reliability of p27 immunohistochemical staining: probing optimal fixation time using high-density tissue microarrays. *Hum Pathol.* 2002;33(7):756-60.
125. Bueno-de-Mesquita JM, Nuyten DS, Wesseling J, van Tinteren H, Linn SC, van de Vijver MJ. The impact of inter-observer variation in pathological assessment of node-negative breast cancer on clinical risk assessment and patient selection for adjuvant systemic treatment. *Ann Oncol.* 2010;21(1):40-7.
126. Bajetta E, Celio L, Di Leo A, Bartoli C, Pilotti S, Leutner M, et al. Effects of short-term pre-operative tamoxifen on steroid receptor and Ki-67 expression in primary breast cancer: an immunocytochemical study. *Int J Oncol.* 1998;12(4):853-8.
127. Miller WR, Dixon JM, Macfarlane L, Cameron D, Anderson TJ. Pathological features of breast cancer response following neoadjuvant treatment with either letrozole or tamoxifen. *Eur J Cancer.* 2003;39(4):462-8.
128. Shimizu D, Ishikawa T, Tanabe M, Sasaki T, Ichikawa Y, Chishima T, et al. Preoperative endocrine therapy with goserelin acetate and tamoxifen in hormone receptor-positive premenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer.* 2014;21(5):557-62.
129. van de Ven S, Smit VT, Dekker TJ, Nortier JW, Kroep JR. Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2011;37(6):422-30.
130. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, Pruneri G, Gentilini O, Veronesi P, et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res.* 2004;10(19):6622-8.
131. Piper GL, Patel NA, Patel JA, Malay MB, Julian TB. Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer results in alterations in preoperative tumor marker status. *Am Surg.* 2004;70(12):1103-6.

132. Frassoldati A, Adami F, Banzi C, Criscuolo M, Piccinini L, Silingardi V. Changes of biological features in breast cancer cells determined by primary chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 1997;44(3):185-92.
133. Makris A, Powles TJ, Allred DC, Ashley SE, Trott PA, Ormerod MG, et al. Quantitative changes in cytological molecular markers during primary medical treatment of breast cancer: a pilot study. *Breast Cancer Res Treat.* 1999;53(1):51-9.
134. Taucher S, Rudas M, Gnant M, Thomanek K, Dubsky P, Roka S, et al. Sequential steroid hormone receptor measurements in primary breast cancer with and without intervening primary chemotherapy. *Endocr Relat Cancer.* 2003;10(1):91-8.
135. Kasami M, Uematsu T, Honda M, Yabuzaki T, Sanuki J, Uchida Y, et al. Comparison of estrogen receptor, progesterone receptor and Her-2 status in breast cancer pre- and post-neoadjuvant chemotherapy. *Breast.* 2008;17(5):523-7.
136. Burcombe RJ, Makris A, Richman PI, Daley FM, Noble S, Pittam M, et al. Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Cancer.* 2005;92(1):147-55.
137. Hirata T, Shimizu C, Yonemori K, Hirakawa A, Kouno T, Tamura K, et al. Change in the hormone receptor status following administration of neoadjuvant chemotherapy and its impact on the long-term outcome in patients with primary breast cancer. *Br J Cancer.* 2009;101(9):1529-36.
138. Shet T, Agrawal A, Chinoy R, Havaladar R, Parmar V, Badwe R. Changes in the tumor grade and biological markers in locally advanced breast cancer after chemotherapy--implications for a pathologist. *Breast J.* 2007;13(5):457-64.
139. MacGrogan G, Mauriac L, Durand M, Bonichon F, Trojani M, de Mascarel I, et al. Primary chemotherapy in breast invasive carcinoma: predictive value of the immunohistochemical detection of hormonal receptors, p53, c-erbB-2, MiB1, pS2 and GST pi. *Br J Cancer.* 1996;74(9):1458-65.
140. Arens N, Bleyl U, Hildenbrand R. HER2/neu, p53, Ki67, and hormone receptors do not change during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Virchows Arch.* 2005;446(5):489-96.
141. Schneider J, Lucas R, Sanchez J, Ruibal A, Tejerina A, Martin M. Modulation of molecular marker expression by induction chemotherapy in locally advanced breast

cancer: correlation with the response to therapy and the expression of MDR1 and LRP. *Anticancer Res.* 2000;20(6B):4373-7.

142. Penault-Llorca F, Cayre A, Bouchet Mishellany F, Amat S, Feillel V, Le Bouedec G, et al. Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome. *Int J Oncol.* 2003;22(6):1319-25.

143. Jain V, Landry M, Levine EA. The stability of estrogen and progesterone receptors in patients receiving preoperative chemotherapy for locally advanced breast carcinoma. *Am Surg.* 1996;62(2):162-5.

144. Taucher S, Rudas M, Mader RM, Gnant M, Sporn E, Dubsky P, et al. Influence of neoadjuvant therapy with epirubicin and docetaxel on the expression of HER2/neu in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;82(3):207-13.

145. Chen S, Chen CM, Yu KD, Zhou RJ, Shao ZM. Prognostic value of a positive-to-negative change in hormone receptor status after neoadjuvant chemotherapy in patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(9):3002-11.

146. Tacca O, Penault-Llorca F, Abrial C, Mouret-Reynier MA, Raoelfils I, Durando X, et al. Changes in and prognostic value of hormone receptor status in a series of operable breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncologist.* 2007;12(6):636-43.

147. Tan QX, Qin QH, Yang WP, Lian B, Wei CY. Prognostic value of hormone receptor status conversion following neoadjuvant chemotherapy in a series of operable breast cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(7):4086-94.

148. Jin X, Jiang YZ, Chen S, Yu KD, Shao ZM, Di GH. Prognostic value of receptor conversion after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: a prospective observational study. *Oncotarget.* 2015;6(11):9600-11.

149. Varga Z, Caduff R, Pestalozzi B. Stability of the HER2 gene after primary chemotherapy in advanced breast cancer. *Virchows Arch.* 2005;446(2):136-41.

150. Vincent-Salomon A, Jouve M, Genin P, Freneaux P, Sigal-Zafrani B, Caly M, et al. HER2 status in patients with breast carcinoma is not modified selectively by preoperative chemotherapy and is stable during the metastatic process. *Cancer.* 2002;94(8):2169-73.

151. Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, Meric-Bernstam F, Hunt KK, Dawood S, et al. Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res*. 2009;15(23):7381-8.
152. Hurley J, Doliny P, Reis I, Silva O, Gomez-Fernandez C, Velez P, et al. Docetaxel, cisplatin, and trastuzumab as primary systemic therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(12):1831-8.
153. Harris LN, You F, Schnitt SJ, Witkiewicz A, Lu X, Sgroi D, et al. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(4):1198-207.
154. Guarneri V, Dieci MV, Barbieri E, Piacentini F, Omarini C, Ficarra G, et al. Loss of HER2 positivity and prognosis after neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer patients. *Ann Oncol*. 2013;24(12):2990-4.
155. Yang SX, Loo WT, Chow LW, Yang XH, Zhan Y, Fan LJ, et al. Decreased expression of C-erbB-2 and CXCR4 in breast cancer after primary chemotherapy. *J Transl Med*. 2012;10 Suppl 1:S3.
156. Faneyte IF, Schrama JG, Peterse JL, Remijnse PL, Rodenhuis S, van de Vijver MJ. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome. *Br J Cancer*. 2003;88(3):406-12.
157. Adams AL, Eltoum I, Krontiras H, Wang W, Chhieng DC. The effect of neoadjuvant chemotherapy on histologic grade, hormone receptor status, and HER2/neu status in breast carcinoma. *Breast J*. 2008;14(2):141-6.
158. Montagna E, Bagnardi V, Viale G, Rotmensz N, Sporchia A, Cancellato G, et al. Changes in PgR and Ki-67 in residual tumour and outcome of breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*. 2015;26(2):307-13.
159. Matsubara N, Mukai H, Fujii S, Wada N. Different prognostic significance of Ki-67 change between pre- and post-neoadjuvant chemotherapy in various subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;137(1):203-12.
160. Qin Q, Gao F, Jiang W, Tan Q, Mo Q, Wei C. Effect of neoadjuvant chemotherapy on expressions of estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor 2, and Ki-67 in breast cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(18):3272-7.

161. Eguiara A, Elorriaga K, Rezola R, García Martín Á. Células madre tumorales: una diana terapéutica en el cáncer de mama. *Revista de Senología y Patología Mamaria*. 2012;25(03):107-15.
162. Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, Hart AH, et al. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med*. 2009;15(8):907-13.
163. Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med*. 2009;15(8):842-4.
164. Castro MA, Onsten TT, de Almeida RM, Moreira JC. Profiling cytogenetic diversity with entropy-based karyotypic analysis. *J Theor Biol*. 2005;234(4):487-95.
165. Heng HH, Stevens JB, Liu G, Bremer SW, Ye KJ, Reddy PV, et al. Stochastic cancer progression driven by non-clonal chromosome aberrations. *J Cell Physiol*. 2006;208(2):461-72.
166. Tsao JL, Yatabe Y, Salovaara R, Jarvinen HJ, Mecklin JP, Aaltonen LA, et al. Genetic reconstruction of individual colorectal tumor histories. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(3):1236-41.
167. Gonzalez-Garcia I, Sole RV, Costa J. Metapopulation dynamics and spatial heterogeneity in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(20):13085-9.
168. Sueta A, Yamamoto Y, Hayashi M, Yamamoto S, Inao T, Ibusuki M, et al. Clinical significance of pretherapeutic Ki67 as a predictive parameter for response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: is it equally useful across tumor subtypes? *Surgery*. 2014;155(5):927-35.
169. Denkert C, Loibl S, Muller BM, Eidtmann H, Schmitt WD, Eiermann W, et al. Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Ann Oncol*. 2013;24(11):2786-93.
170. Fasching PA, Heusinger K, Haeberle L, Niklos M, Hein A, Bayer CM, et al. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer*. 2011;11:486.
171. Hess KR, Anderson K, Symmans WF, Valero V, Ibrahim N, Mejia JA, et al. Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with

paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4236-44.

172. Cheang MC, Martin M, Nielsen TO, Prat A, Voduc D, Rodriguez-Lescure A, et al. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *Oncologist*. 2015;20(5):474-82.

173. Prat A, Bianchini G, Thomas M, Belousov A, Cheang MC, Koehler A, et al. Research-based PAM50 subtype predictor identifies higher responses and improved survival outcomes in HER2-positive breast cancer in the NOAH study. *Clin Cancer Res*. 2014;20(2):511-21.